

PCT/KR 02/01975

RO/KR 22.10.2002

REC'D 25 NOV 2002

WIPO

PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0021488  
Application Number PATENT-2002-0021488

출원년월일 : 2002년 04월 19일  
Date of Application APR 19, 2002

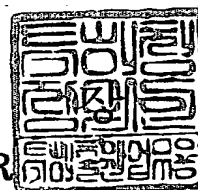
출원인 : 김인산 외 1명  
Applicant(s) KIM, IN SAN, et al.



2002 년 10 월 22 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.04.19
【발명의 명칭】	$\beta$ i g - h 3 단백질의 정량방법 및 이를 이용한 진단키트
【발명의 영문명칭】	Method for measuring quantity of $\beta$ i g - h 3 protein and diagnosis kit using the same
【출원인】	
【성명】	김인산
【출원인코드】	4-1999-051926-0
【출원인】	
【명칭】	주식회사 리젠 바이오텍
【출원인코드】	1-2000-037614-6
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2000-026063-1
【포괄위임등록번호】	2000-066599-3
【발명자】	
【성명】	김인산
【출원인코드】	4-1999-051926-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	배종섭
【성명의 영문표기】	BAE, Jong-Sub
【주민등록번호】	750429-1768219
【우편번호】	704-824
【주소】	대구광역시 달서구 송현1동 1940-2
【국적】	KR
【우선권주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허

**【출원번호】** 10-2001-0020991  
**【출원일자】** 2001.04.19  
**【증명서류】** 첨부  
**【심사청구】** 청구  
**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**  
**【서열개수】** 10  
**【서열목록의 전자파일】** 첨부  
**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대  
리인 이원  
회 (인)  
**【수수료】**  
**【기본출원료】** 20 면 29,000 원  
**【가산출원료】** 57 면 57,000 원  
**【우선권주장료】** 1 건 26,000 원  
**【심사청구료】** 12 항 493,000 원  
**【합계】** 605,000 원  
**【감면사유】** 소기업 (70%감면)  
**【감면후 수수료】** 199,700 원  
**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)\_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류\_1  
통

## 【요약서】

## 【요약】

본 발명은  $\beta$ ig-h3 단백질의 정량방법 및 이를 이용한 진단키트에 관한 것으로서, 구체적으로  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질 및 그의 항체를 항원-항체 반응 방법에 사용하여 피검시료 채액 중에 포함된  $\beta$ ig-h3 단백질의 양을 측정하는 방법 및  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질 및 그의 항체를 포함하는 신장 질환, 간 질환 및 류마티스 질환 등의 진단키트에 관한 것이다. 본 발명의  $\beta$ ig-h3 정량방법 및 진단키트는 신장 질환, 간 질환 및 류마티스 질환을 비롯한 각종 질환의 손상정도 및 진행정도를 조기에 예민하게 반영하는 효과적인 검사 방법으로 유용하게 사용할 수 있다.

## 【대표도】

도 10

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

$\beta$  ig-h 3 단백질의 정량방법 및 이를 이용한 진단키트(Method for measuring quantity of  $\beta$  ig-h 3 protein and diagnosis kit using the same)

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은  $\beta$  ig-h3 재조합 단백질의 구조를 나타내는 모식도이고,

I, II, III 및 IV : 각 도메인(domain),

▣ 및 ▢ : 염기 서열이 보존된 영역

A ;  $\beta$  ig-h3,                      B ; 인간  $\beta$  ig-h3,                      C ; 마우스  $\beta$  ig-h3

도 2는  $\beta$  ig-h3의 IV 도메인(domain)의 반복에 의해 재조합된  $\beta$  ig-h3 D-IV 단백질들의 기하학적 구조를 나타내는 개략도이고,

A ;  $\beta$  ig-h3,                      B ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(1x), C ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(2x),

D ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(3x), E ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(4x)

도 3은 분리된  $\beta$  ig-h3 재조합 단백질의 전기영동(electrophoresis) 사진이고,

1 ; 인간  $\beta$  ig-h3,                      2 ; 마우스  $\beta$  ig-h3

도 4는  $\beta$  ig-h3 D-IV(1x, 2x, 3x, 4x) 단백질들을 전기영동법으로 확인한 사진이고,

1 ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(1x),                      2 ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(2x),

3 ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(3x),                      4 ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(4x)

도 5는 일차 항체를 이용하여 웨스턴 블롯(western blot)으로 인간  $\beta$ ig-h3와 마우스  $\beta$ ig-h3를 확인한 결과를 보여주는 전기영동 사진이고,

1 ; 인간  $\beta$ ig-h3,                      2 ; 마우스  $\beta$ ig-h3

도 6은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)의 원리를 보여주는 개략도이고,

도 7은 일차항체의 정량적 비율을 나타낸 그래프이고,

◆ ; 1 : 200,      ■ ; 1 : 400,      ▲ ; 1 : 800,  
× ; 1 : 1600,      ※ ; 1 : 2000,      ● ; 1 : 3200

도 8은 이차항체의 정량적 비율을 나타낸 그래프이고,

A ; 1:1600으로 일차항체 고정,

B ; 1:2000으로 일차항체 고정,

◆ ; 1:1000으로 이차항체 희석,

■ ; 1:2000으로 이차항체 희석,

● ; 1:3000으로 이차항체 희석

도 9는 인간  $\beta$ ig-h3 단백질의 코팅 농도를 나타낸 그래프이고,

◆ ; 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ,                      ■ ; 1.0  $\mu\text{g/ml}$

도 10은 교차실험을 통하여 인간  $\beta$ ig-h3 단백질과 마우스  $\beta$ ig-h3 단백질을 표준 단백질로 사용할 수 있음을 보여주는 그래프이고,

◆ ; 인간  $\beta$  ig-h3 단백질 코팅 농도 0.5  $\mu$ g/ml, 일차 항 인간  $\beta$  ig-h3 항체 1:2000, 이차항체 1:2000,

■ ; 인간  $\beta$  ig-h3 단백질 코팅 농도 0.5  $\mu$ g/ml, 일차 항 마우스  $\beta$  ig-h3 항체  
1:2000, 이차항체 1:2000,

▲ ; 마우스  $\beta$  ig-h3 단백질 코팅 농도 0.5  $\mu$ g/ml, 일차 항 인간  $\beta$  ig-h3 항체  
1:2000, 이차항체 1:2000,

× ; 마우스  $\beta$  ig-h3 단백질 코팅 농도 0.5  $\mu$ g/ml, 일차 항 마우스  $\beta$  ig-h3 항체  
1:2000, 이차항체 1:2000

도 11은 교차실험을 통하여 재조합  $\beta$  ig-h3 D-IV(1x) 단백질과 재조합  $\beta$  ig-h3  
D-IV(4x) 단백질을 표준단백질로 사용할 수 있음을 보여주는 그래프이고,

A의 ◆ ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(1x) 코팅 농도 0.5  $\mu$ g/ml, 일차 항 인간  $\beta$  ig-h3 항체  
1:2000, 이차항체 1:2000,

A의 ■ ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(4x) 코팅 농도 0.5  $\mu$ g/ml, 일차 항 인간  $\beta$  ig-h3 항체  
1:2000, 이차항체 1:2000,

B의 ◆ ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(1x) 코팅 농도 0.5  $\mu$ g/ml, 일차 항 마우스  $\beta$  ig-h3 항체  
1:2000, 이차항체 1:2000,

B의 ■ ;  $\beta$  ig-h3 D-IV(4x) 코팅 농도 0.5  $\mu$ g/ml, 일차 항 마우스  $\beta$  ig-h3 항체  
1:2000, 이차항체 1:2000

도 12는 신장조직 내에서  $\beta$  ig-h3의 발현 양상을 보여주는 면역조직화학적 염색 사  
진이고,

A의 ► ; S3 근위 세관 세포(proximal tubular cell)의 기저막에서의 발현 양상,

B의 ► ; 사구체의 보우만낭(Bowman's capsule)의 기저막에서의 발현 양상

B의 → ; 피질 후 상지 세포(cortical thick ascending limb cell)의 기저막에서의  
발현양상

도 13은 당뇨병 유발 래트의 소변에서  $\beta$ ig-h3를 측정한 결과를 보여주는 그래프이고,

■ ; 대조군,

□ ; 스트렙토조토신(streptozotocin)을 투여하여 당뇨병을 유발한 래트

도 14는 도 13의 당뇨병 유발 래트의 소변에서  $\beta$ ig-h3를 측정한 결과를 각 개체별로 나타낸 그래프이고,

도 15는 신장 이식 후 정상인 경우(normal), 이식 받은 신장의 크기가 작은 경우(Nephron underdose), 만성거부(chronic rejection), 신우염의 재발(Recurrent GN) 및 사이클로스포린 독성(CyA toxicity)이 나타난 경우를 분류하여 소변의  $\beta$ ig-h3 단백질의 농도를 측정한 그래프이고,

도 16은 신장이식 수술후 국소성분절성사구체경화증(focal segmental glomerulosclerosis (FSGS))이 재발하여 혈장교환술(plasmapheresis)치료를 받는 환자의 날짜에 따른  $\beta$ ig-h3 단백질의 농도를 측정한 그래프이고,

도 17은 살아있는 사람의 신장(Living donor)이나 사망한 사람의 신장(Cadaver donor), 이식한 신장의 크기가 작아서 신기능이 충분하지 않은 경우(Underdose) 또는 거부(Rejection) 환자의 소변에서 신장이식 전후의  $\beta$ ig-h3 단백질의 농도를 측정한 그래프이다.



## 【발명의 상세한 설명】

## 【발명의 목적】

## 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<48> 본 발명은  $\beta$ ig-h3 단백질의 정량방법 및 이를 이용한 진단키트에 관한 것으로서, 구체적으로  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질 및 그 항체를 항원-항체 반응에 사용하여 피검시료 채액 중에 포함된  $\beta$ ig-h3 단백질의 양을 측정하는 방법 및  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질 및 그 항체를 포함하는 신장 질환, 간 질환 및 류마티스 질환 등의 진단키트에 관한 것이다.

<49>  $\beta$ ig-h3은 인간의 흑색소 세포종 세포(human melanoma cells), 포유동물의 상피세포(mammary epithelial cells), 각질형성세포(keratinocytes) 및 허파 섬유아세포(lung fibroblasts) 등을 포함하는 여러 종류의 세포에서 TGF- $\beta$ 에 의해 유도되는 세포외기질 단백질(extracellular matrix protein)이다. 상기 TGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )는 여러 종류의 세포들의 성장과 분화에 관여하는 물질로 포유류에서는 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 및 TGF- $\beta$ 3의 세 가지 종류가 존재하고, 성장조절, 면역반응의 조절, 골생성의 자극, 연골특이적 분자(cartilage specific macromolecule)의 유도, 창상치유 촉진 등의 여러 가지 복잡한 기능을 한다고 알려져 있다(Bennett, N.T. et al., *Am. J. Surg.* 1993, 165, 728). 이러한 TGF- $\beta$ 는 창상치유시기의 상피세포에서 발현되는데, 이는 재상피화 동안 각질형성세포(keratinocyte)내의 인테그린(integrin) 분자의 발현을 자극하기

위한 것으로 보여진다. TGF- $\beta$  발현에 관한 최근 연구에서 TGF- $\beta$  mRNA가 정상 피부의 상피나 급성 및 만성 창상에서 재생되는 상피층에서 발현되고, TGF- $\beta$  1 mRNA는 정상 피부와 만성 창상에서는 발현되지 않으나 급성 창상에서 재생되는 상피층에서 발현되며, TGF- $\beta$  2 mRNA는 발현되지 않는다는 것이 밝혀졌다(Schmid, P. et al., *J. Pathol.*, 1993, 171, 191). 아직까지 상기 기작에 대한 정설이 확립된 것은 아니지만 TGF- $\beta$ 가 재생피화에 큰 역할을 할 것으로 예측된다.

<50>      상기한 TGF- $\beta$ 의 관련 유전자로 알려진  $\beta$  ig-h3는 스톤니어 등에 의해 처음 동정된 유전자로, TGF- $\beta$  1을 처리한 인간의 허파 선암종(lung adenocarcinoma) 세포주인 A549 세포주에서 cDNA 라이브러리 스크리닝(differential screening) 자료의 선별 중 동정되었으며, TGF- $\beta$  1으로 처리한 후 2 일만에 20 배 이상의 증가를 보이는 것으로 보고되었다(Stonier, J, et al., *DNA cell Biol.*, 1992, 11, 511). DNA 서열분석에 의하여  $\beta$  ig-h3 단백질은 아미노 말단 분비 서열(amino-terminal secretory sequence)과 몇 가지 인테그린에 대한 리간드 식별(ligand recognition)이 가능한 카르복시 말단(carboxy-terminal) Arg-Gly-Asp(RGD) 서열을 가진 서열번호 1로 기재되는 683개의 아미노산으로 구성되어 있음이 밝혀졌다.

<51>       $\beta$  ig-h3는 RGD 모티프와 함께 상동성을 지닌 4개의 내부 반복

도메인(internal repeated domain)을 포함하는데, 이들은 포유류, 곤충, 성게(sea urchin), 식물, 효모 및 세균을 포함하는 여러 종의 분비 단백질 또는 막 단백질에서 매우 보존적인 서열로서 발견된다. 상기 보존적 서열을 포함하는 단백질들에는 페리오스틴(periostin), 파스시클린 I (fasciclin I), 성게 HLC-2, 알갈-CAM(algal-CAM) 및 마이코박테리움 MPB70(myobacterium MPB70) 등이 포함된다. (Kawamoto, T. et al., ., 1998, 1395, 288). 이러한 단백질들에서 보존적으로 발견되는 상동성 도메인(이하 "파스-1(fas-1)도메인"이라 약칭함)은 110 내지 140개의 아미노산으로 구성되며 약 10개의 아미노산으로 구성된 매우 보존적인 두 개의 가지(H1 및 H2)를 포함하고 있다. 상기 단백질들 중  $\beta$ ig-h3, 페리오스틴 및 파스시클린 I 은 4개의 파스-1 도메인을 가지며, HLC-2는 2개, MPB70은 오직 한 개의 파스-1 도메인을 가지고 있다. 상기 단백질들의 생물학적 기능이 정확하게 밝혀진 것은 아니지만, 이들 중 몇몇이 세포 부착 분자(cell adhesion molecule)로서 세포 부착(attachment)과 탈착(detachment)을 매개하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면,  $\beta$ ig-h3, 페리오스틴 및 파스시클린 I 은 각각 섬유아세포, 골아세포 및 신경세포의 부착을 매개하는 것으로 보고되었으며, 알갈-CAM은 조류 볼복스(Vovolx)의 배(embryos)에 존재하는 세포 부착 분자임이 밝혀졌다(LeBaron, R. G., et al., *J. Invest. Dermatol.*, 104, 844, 1995; Horiuchi, K. et al., *J. Bone Miner. Res.*, 1999, 14, 1239; Huber, O. et al., ., 1994, 13, 4212).

<52> 정제된  $\beta$ ig-h3 단백질은 피부 섬유아세포의 부착과 확산을 촉진시키는 한편 무혈 청배지에서 A549, HeLa 및 WI-38 세포의 부착을 저해한다. 특히,  $\beta$ ig-h3은 종양세포의

성장, 콜로니 형성 및 출현을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 실례로 차이니스 햄스터의 난소 세포(Chinese hamster ovary cells)에  $\beta$ ig-h3 발현백터를 전이(transfection)시킨 누드 마우스에서 상기 세포들의 종양 형성능이 현저하게 감소된다는 것이 미국특허 제5,599,788호 및 제5,714,588호에 개시되어 있다. 또한, 빠르고 효과적인 상처 치유를 위하여 유효한 양의  $\beta$ ig-h3을 상처와 접촉시킴으로써 세포, 특히 섬유아세포가 상처부위에 퍼지고 점착하는 것을 촉진시킬 수 있는 방법이 상기 특허들에 개시되어 있다. 따라서,  $\beta$ ig-h3는 여러 세포에서 TGF- $\beta$ 에 의해 고도로 유도되는 세포 부착 분자로서 세포 성장(cell growth), 세포 분화(cell differentiation), 창상 치유(wound healing), 형태 형성(morphogenesis) 및 세포 부착(cell adhesion)에 있어 매우 중요한 역할을 담당한다.

<5>      상기와 같이  $\beta$ ig-h3는 의학적으로 여러 가지 유용성이 기대되는 물질이면서도 생체 내에서 극소량밖에 채취할 수 없어 안정적인 공급이 곤란한 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 유전자 재조합에 의하여 진핵생물 세포계에서 발현시켜 제조하는 방법이 개발되었으나, 진핵생물 세포계에서 발현시키는 경우  $\beta$ ig-h3를 만들어내는 세포는 만들지 않는 세포보다 세포의 성장이 훨씬 느리므로 충분한 양의 세포수를 확보하기 어렵다. 따라서 본 발명자들은 대장균을 숙주로 하여  $\beta$ ig-h3 단백질의 전체 및 그 일부 도메인을 포함하는 재조합 단백질을 대량 발현시키는 정제 방법을 확립하고, 재조합 단백질이 세포 부착 및 확산을 지지하는 것을 확인하여 출원한 바 있다(대한민국 특허출원 제2000-25664호).

<54> 한편, 세포 부착 분자로서  $\beta$ ig-h3의 세포 부착 활성은 인간의 피부 섬유아세포 (dermal fibroblasts)에서 최초로 보고된 후 연골아세포(chondrocytes), 복막 섬유아세포(peritoneal fibroblasts) 및 인간의 MRC5 섬유아세포 등에서도 보고되었다. 이러한  $\beta$ ig-h3의 세포 부착 활성은 초기에는  $\beta$ ig-h3의 카르복실-말단에 존재하는 RGD 모티프에 의해 매개되는 것으로 여겨졌으나, RGD 모티프가 연골아세포의 분산을 촉진하는데 필요하지 않으며 카르복실-말단 프로세스(carboxyl-terminus processing)에 의해 RGD 모티프가 결실된 성숙한 형태의  $\beta$ ig-h3이 세포 부착을 억제할 수 있음이 보고되면서 RGD 모티프가  $\beta$ ig-h3의 세포 부착 활성을 매개하는데 필수불가결한 요소가 아님이 확인되었다. 또한, 최근의 연구 결과에서  $\beta$ ig-h3는 인테그린  $\alpha 1\beta 1$ 을 통해 섬유아세포의 분산을 증가시키는 반면  $\beta$ ig-h3의 RGD 모티프는  $\beta$ ig-h3-매개성 세포 분산에 요구되지 않으며,  $\beta$ ig-h3가 독자적으로 인테그린  $\alpha 1\beta 1$ 과 작용하여 세포의 유착과 확장을 촉진시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다(Ohno, S., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1451, 196). 또한,  $\beta$ ig-h3 내 보존적 H1 및 H2 펩타이드 역시  $\beta$ ig-h3-매개성 세포 부착에 효과적인 영향을 미치지 못하는 것이 확인되었다. 이러한 결과는  $\beta$ ig-h3의 세포 부착 활성을 위한 필수적인 아미노산이 H1 및 H2 지역이 아닌 다른 곳에 존재함을 의미하며,  $\beta$ ig-h3의 반복 파스-1 도메인 뿐만 아니라 다른 단백질들의 파스-1 도메인들과의 상동성을 비교한 컴퓨터 분석 결과 역시 H1 및 H2 이외에도 여러 개의 매우 보존적인 아미노산이 존재하여 이들이 세포 부착 활성에 관여할 수 있음을 제시하였다.

<55> 따라서, 본 발명자들은 세포 부착 및 탈착 활성에 관여하는 보존적 모티프를 밝히고 이를 포함하는 펩타이드를 제조하고자 연구한 결과, 세포 부착 분자로서 알려진  $\beta$ ig-h3의 제 2 및 제 4 도메인을 이용하여 기능적 세포 수용체로서  $\alpha 3\beta 1$  인테그린과 결

합하여 세포 부착 및 탈착 활성을 매개하는 펩타이드 NKDIL 및 EPDIM 및 그의 유도체를 제조하고,  $\beta$ ig-h3의 제 2 및 제 4 도메인 내 H2 지역 근처에 위치하는 두 개의 매우 보존적 아미노산인 아스파르트산(aspartic acid, Asp) 및 이소루이신(isoleucine, Ile)이 세포 부착 및 탈착 활성을 위한 필수적인 아미노산으로 작용함을 밝혀 특허출원한 바 있다(대한민국 특허출원 제2000-25665호).

<56> 한편, 지금까지  $\beta$ ig-h3는 인간에 있어서의 몇몇 종양과의 관련성 외에는  $\beta$ ig-h3가 직접적으로 다른 질환과 관련이 있다는 보고는 없는 실정이고, 특히  $\beta$ ig-h3 단백질의 발현과 신장질환, 간질환 및 류마티스의 발병과의 직접적인 관계에 대해서는 전혀 알려져 있지 않으며 체액에서  $\beta$ ig-h3 단백질의 양을 측정하여 질환과 연결할 수 있을 가능성에 대해 전혀 보고된 바 없다.

<57> 이에, 본 발명자들은  $\beta$ ig-h3 또는  $\beta$ ig-h3의 4번째 파스-1 도메인을 여러 개 연결하여 재조합한 단백질을  $\beta$ ig-h3 측정시의 표준단백질로 사용하는  $\beta$ ig-h3의 정량방법 및 이를 이용하여  $\beta$ ig-h3를 정량하는 진단키트를 개발하고 상기 방법을 이용하여 신장질환, 간질환 및 류마티스를 비롯한 여러 질환을 조기에 예민하게 진단하고 치료에 대한 반응정도 예후 판정을 할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

## 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<58> 본 발명의 목적은  $\beta$  ig-h3 단백질 또는  $\beta$  ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질을 사용한  $\beta$  ig-h3 단백질의 정량방법 및 상기 정량방법을 이용한 진단키트를 제공하는 것이다.

## 【발명의 구성 및 작용】

<59> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은  $\beta$  ig-h3 단백질을 정량하는 방법을 제공한다.

<60> 또한, 본 발명은 상기  $\beta$  ig-h3 단백질의 정량방법을 이용한 신장 질환, 간질환 및 류마티스 질환의 진단키트를 제공한다.

<61> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<62> 본 발명의  $\beta$  ig-h3의 정량방법은

<63> 1)  $\beta$  ig-h3 단백질 또는  $\beta$  ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질을 제조하는 단계(단계 1);

<64> 2) 상기 단계 1의 단백질에 대한 항체를 제조하는 단계(단계 2); 및

<65> 3) 상기 단계 1의 단백질 및 단계 2의 항체를 항원-항체 반응을 이용한 정량방법에 사용하여 피검시료 중에 포함된  $\beta$  ig-h3 단백질의 양을 측정하는 단계(단계 3)로 구성된다.

- <66>     상기 단계 1에서  $\beta$ ig-h3 단백질은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 인간  $\beta$ ig-h3 단백질 또는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 마우스  $\beta$ ig-h3 단백질이다. 인간과 마우스의  $\beta$ ig-h3 단백질 구성요소는 도 1에 나타내었으며, 도 1에서 해칭된 칸과 크로스 해칭된 칸은 반복되는 파스-1 도메인인 I, II, III, IV의 매우 보존된 서열을 나타내며 빈칸은 RGD 모티프를 나타낸다.
- <67>      $\beta$ ig-h3 단백질은 4개의 파스-1 도메인을 갖고 있는데, 상기 단계 1의  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인은  $\beta$ ig-h3 단백질의 1번째 내지 4번째 파스-1 도메인 중에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 도메인을 사용할 수 있고, 4번째 파스-1 도메인이 사용되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 4번째 파스-1 도메인은 단독으로 또는 여러개 반복연결한 재조합 단백질로 사용될 수 있으며, 1 ~ 10개 연결한 것이 바람직하며, 1 - 4개 연결한 재조합 단백질을 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 본 발명에서는 바람직한 실시예로서  $\beta$ ig-h3의 4번째 도메인을 1개, 2개, 3개 또는 4개 연결하여 재조합한 단백질을 사용한 경우를 예시하였다.
- <68>     본 발명에서는  $\beta$ ig-h3의 아미노산 서열 중 502부터 632까지의 제 4 파스-1 도메인을 각각 1개 내지 4개 포함하는 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 제조하였으며, 이를 각각 " $\beta$ ig-h3 D-IV(1x)", " $\beta$ ig-h3 D-IV(2x)", " $\beta$ ig-h3 D-IV(3x)" 및 " $\beta$ ig-h3 D-IV(4x)"라 명명하였다(도 4 참조).
- <69>     본 발명의 표준단백질을 제조함에 있어서 발현벡터와 형질전환은 통상의 방법으로 행해질 수 있다.



- <70>      상기 단계 2의  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 항체는 상기 단계 1의 단백질 또는 재조합 단백질을 항원으로 사용하여 일차항체를 제조하였다. 상기 일차항체의 제조는 통상적인 방법으로 행해질 수 있으며, 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체를 사용할 수 있다.
- <71>      상기 단계 3의 피검시료 중에 포함된  $\beta$ ig-h3 단백질의 양을 측정하는 것은 항원-항체 결합을 원리로 하는 모든 정량분석방법이 사용될 수 있으며, 면역블롯팅(*Current Protocols in Molecular Biology*, vol 2, chapter 10.8; David et al., *Cells(a Laboratory manual)*, vol 1, chapter 73), 면역침전법(*Current Protocols in Molecular Biology*, vol 2, chapter 10.16; *Cells(a Laboratory manual)*, vol 1, chapter 72), ELISA 방법(*Current Protocols in Molecular Biology*, vol 2, chapter 11.2; *ELISA Theory and Practice*, John R. Crowther; *The ELISA Guidebook*, John R. Crowther), RIA(Radioimmuno assay)(*Nuklearmedizin* 1986 Aug ;25(4):125-127, Tumor markers as target substances in the radioimmunologic detection of malignancies. von Kleist S; Mariani G. *Ann Oncol* 1999 ;10 Suppl 4:37-40), 단백질칩(Daniel Figeys et.al, *Electrophoresis* 2001, 22, 208-216; Albala JS. *Expert Rev Mol Diagn* 2001 Jul;1 (2):145-152), 래피드 어세이(rapid assay)(Kasahara Y and Ashihara Y, *Clinica Chimica Acta* 267 (1997), 87-102; 대한민국 특허출원 2000-46639) 또는 마이크로어레이(microarray)(Vivian G. cheung et al, *Nature genetics* 1999, 21, 15-19; Robert J. Lipshutz et al, *Nature genetics* 1999, 21, 20-24; Christine Debouck and Peter N. Goodfellow, *Nature genetics* 1999, 21, 48-50; *DNA Microarrays*, M. Schena)로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법을 사용하는 것이 바람직

하고, ELISA 방법을 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 또한, ELISA 방법과 더불어 공지의 생물학적 마이크로칩(biological microchip) 및 자동화된 미세배열 시스템(microarray system)을 이용하여 대량으로 시료를 분석할 수 있 수 있으며, 소변에서는 간편한 형태의 자가 진단법으로 개발될 수 있다.

<72> 본 발명의 실시예에 따르면, 위에 열거된 여러 방법 중 ELISA를 이용하여 경쟁법(competition assay)으로 상기  $\beta$ ig-h3 단백질의 양을 측정하는 것은

<73> 1)  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질을 기질에 코팅시키는 단계(단계 1);

<74> 2) 상기 단계 1의 단백질에 대한 항체를 피검시료와 반응시키는 단계(단계 2);

<75> 3) 단계 1의 코팅된 단백질에 단계 2의 반응물을 첨가하여 반응시킨 후 세척하는 단계(단계 3); 및

<76> 4) 단계 3의 반응물에 2차 항체를 첨가하여 반응시키고 흡광도를 측정하는 단계(단계 4)를 포함한다.

<77> 상기 단계 1의 기질은 통상적으로 사용되는 모든 기질을 사용할 수 있고, 니트로셀룰로오즈 막, 폴리비닐(Polyvinyl) 수지로 합성된 플레이트(예; 96 웰 플레이트), 폴리스티렌(Polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 사용될 수 있다.

<78> 또한, 상기 단계 4의 2차 항체에는 효소, 형광물질, 발광물질, 방사선 물질 또는 금속킬레이트를 표지하여 사용한다. 표지 물질은 통상적으로 사용되는 모든 것을 사용할 수 있고, 발색효소는 과산화효소(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(Alkaline Phosphatase),  $\beta$ -D-갈락토시다제, 말레이트 탈수소효소, 스타필로코커스 누클리아제, 서양고추냉이 과산화효소, 카탈라제, 아세틸콜린 에스터라제 등을 사용하는 것이 바람직하며, 형광물질은 이소티오시아네이트(fluorescein isothiochanate), 피코빌린(phycoobilin) 단백질, 로다민(rhodamine), 피코에리트린(phycoerythrin), 피키시아닌(phyococyanin), 오르토프탈릭 알데히드(orthophthalic aldehyde)등을 사용하는 것이 바람직하다.

<79> 또한, 발색효소 또는 형광물질 외에 2차 항체를 표지할 물질로는 이소루미놀(isolumino), 루시게닌(lucigenin), 루미놀(luminol), 방향족 아크리딘에스테르(acridiniumester), 이미다졸, 아크리딘 염, 루시페린(luciferin), 루시퍼라제(luciferase), 아쿠오린(aequorin) 등의 발광물질 또는  $^{125}\text{I}$ ,  $^{127}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  등의 방사선 물질 뿐만 아니라 면역학적 측정법에 사용될 수 있으면 특히 한정하지 않는다. 또한 항체에 바이오틴, 디니트로페닐, 피리독실 또는 플루오레자민과 같은 저분자 헵텐을 사용할 수 있다.

<80> 또한, 단계 4에서 발색효소를 사용할 경우 이의 활성을 측정하기 위하여, 발색기질을 사용하며, 발색기질은 2차 항체에 결합된 발색효소에 대하여 발색할 수 있는 모든 물질을 사용할 수 있고, 4CN(4-chloro-1-naphtol), DAB(Diaminobenzidine), AEC(Aminoethyl carbazole), ABTS[2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD(o-Phenylenediamine) 및 TMB(Tetramethyl Benzidine)등을 사용할 수 있다.

- <81> 상기 단계 2의 피검시료는  $\beta$ ig-h3와 관련된 질환을 앓는 환자이고, 모든 종류의 체액이 피검재료가 될 수 있고, 신장 질환, 간 질환 또는 류마티스 환자의 소변, 혈액 또는 활막액인 것이 바람직하다.
- <82> 본 발명에서는 상기  $\beta$ ig-h3 단백질의 정량방법이 정확하게  $\beta$ ig-h3 단백질을 정량하는지 확인하기 위하여, 마우스  $\beta$ ig-h3 또는  $\beta$ ig-h3의 4번째 파스-1 도메인을 하나 이상 포함하는 재조합 단백질을 표준단백질로 사용하여 측정하였고, 이를 인간  $\beta$ ig-h3를 표준단백질로 사용한 경우와 비교하였다.
- <83> 본 발명의  $\beta$ ig-h3의 정량방법에 있어서 인간  $\beta$ ig-h3 단백질의 최적 코팅농도 및 항체의 정량적 비율을 결정한 결과, 일차 항 인간  $\beta$ ig-h3 항체의 정량적 비율은 1:1600과 1:2000일 때 그래프가 직선을 이루게 되므로 상기 비율이 가장 적당함을 확인하였고(도 7 참조), 이차항체의 정량적 비율은 1:2000의 비율일 때 그래프가 직선을 이루게 되므로 상기 비율이 가장 적당한 비율임을 확인하였으며(도 8 참조), 인간  $\beta$ ig-h3 단백질은 1.0  $\mu$ g/ml과 0.5  $\mu$ g/ml 두 가지 경우 모두 그래프가 직선을 나타내어 정량적 범위로 적당하였지만 1.0  $\mu$ g/ml보다 0.5  $\mu$ g/ml이 피어슨의 곱 모멘트 상관 계수( $R^2$ )값이 1에 가까운 형태로 나타나서 코팅 농도는 0.5  $\mu$ g/ml일 때 가장 적당함을 확인하였다(도 9 참조).
- <84> 상기 결과로부터, 본 발명자들은 인간  $\beta$ ig-h3 표준단백질의 코팅 농도를 0.5  $\mu$ g/ml로 하고 일차 항 인간  $\beta$ ig-h3 항체 및 이차항체의 희석 비율은 각각 1:2000으로 하는 것이 최적의 조건임을 확인하였다.

<85> 본 발명자들은 인간  $\beta$ ig-h3의 경우와 동일한 방법으로 마우스  $\beta$ ig-h3, 재조합  $\beta$ ig-h3 D-IV(1x), ig-h3 D-IV(2x), ig-h3 D-IV(3x) 및  $\beta$ ig-h3 D-IV(4x)를 사용하여 단백질의 농도, 일차항체 및 이차항체의 정량적 비율을 결정하였다. 구체적으로, 각 단백질의 코팅 농도를 0.5  $\mu$ g/ml로 하고, 일차 항 인간  $\beta$ ig-h3 항체 및 이차항체는 1:2000으로 하여 정량적 실험을 하였으며, 또한 일차 항 마우스  $\beta$ ig-h3 항체 및 이차항체는 1:2000으로 하여 정량적 실험을 하였다.

<86> 그 결과, 모든 경우에 있어서 그래프가 직선을 형성하였고, 측정범위 역시 11 ng/ml에서 900 ng/ml로 서로 비슷함을 확인하였다(도 11 및 도 12 참조).

<87> 상기의 결과로부터, 표준단백질은 인간  $\beta$ ig-h3, 마우스  $\beta$ ig-h3, 재조합  $\beta$ ig-h3 D-IV(1x), ig-h3 D-IV(2x), ig-h3 D-IV(3x) 및  $\beta$ ig-h3 D-IV(4x) 중 어느 것을 사용해도 무방하며, 일차항체의 경우도 교차작용이 있으므로 항 인간  $\beta$ ig-h3 항체나 항 마우스  $\beta$ ig-h3 항체 중 어느 것을 사용해도 됨을 확인하였다.

<88> 본 발명에 있어서 표준단백질의 코팅농도는 0.1 내지 2.0  $\mu$ g/ml의 범위인 것이 바람직하며 0.5 내지 1.0  $\mu$ g/ml인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 일차항체 및 이차항체의 비율은 1:400 내지 1:3200인 것이 바람직하며, 1:2000인 것이 더욱 바람직하다.

<89> 본 발명은 신장 질환, 간 질환 또는 류마티스 질환을 앓고 있는 검체의 체액에서  $\beta$ ig-h3 단백질 양의 측정을 통한 여러 질환의 진단키트를 제공한다.

<90> 본 발명의 진단키트에는  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질과  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 항체를 포함한다. 또한, 상기에 추가적으로 완충용액, 2차 항체, 세척액, 반응정지액 또는 발색기질을 포함할 수 있다.

<91> 본 발명의 진단키트는 신장 질환, 간 질환 및 류마티스 질환을 비롯한 모든 체액에서  $\beta$ ig-h3 단백질의 측정을 통하여 여러가지 질환을 진단할 수 있다.

<92> 신장 질환의 병리기전에 중요한 역할을 하는 TGF- $\beta$ 에 의해  $\beta$ ig-h3의 발현이 강력하게 유도된다는 점에 착안하여 신장 질환과  $\beta$ ig-h3 발현과의 상관관계를 원리로 하여  $\beta$ ig-h3를 정량하여 신장 질환을 진단한다. 이를 확인하기 위하여 신장 질환을 일으키는 대표적인 질환인 당뇨병 환자를 상대로 소변에서의  $\beta$ ig-h3를 측정하여 보면, 마이크로알부민뇨(microalbuminuria)를 포함하는 당뇨병성 신장 질환자의 소변  $\beta$ ig-h3의 농도는 정상인에 비해 5배 이상의 높은 수치를 보였으며 임상적으로 당뇨병성 신장 질환을 나타내지 않는 환자에서도  $\beta$ ig-h3의 농도가 증가하였다. 당뇨병성 신장 질환을 가진 환자의 소변  $\beta$ ig-h3는 대부분의 환자에서 정상보다 높은 수치를 보였으며 임상적으로 신장질환이 없는 환자의 일부분도 높은 수치를 나타내었다. 상기의 결과로 볼 때 소변  $\beta$ ig-h3는 신장의 손상정도를 잘 반영한다고 할 수 있으며 특히 임상적으로 신장 질환을 나타내지 않는 당뇨병 환자의 일부에서도 높은 수치를 보이는 것은 이들 환자가 임상적으로 드러나는 뚜렷한 신장기능 장애는 없지만 어느 정도 신장의 손상을 입고 있다는 것을 의미한다. 따라서, 소변의  $\beta$ ig-h3 측정은 신장의 손상을 조기에 반영하는 감

도가 높은 진단적 의의를 가지며, 기존의 신장기능을 반영하는 어떤 검사보다도 조기에 신장의 손상을 반영할 수 있음을 확인하였다.

<93> 또한, 소변에서의  $\beta$ ig-h3 농도가 당뇨병 환자의 신장 손상을 조기에 반영하는지를 확인하기 위하여, 당뇨병 유발 동물 모델에서  $\beta$ ig-h3 농도를 측정하여 보면, 당뇨병 유발 전보다 5일이 경과한 후에  $\beta$ ig-h3 농도가 약 4배 정도 증가하였다(도 13 참조). 당뇨병이 유발된 후 각 개체에서의  $\beta$ ig-h3 농도 변화를 살펴보면 모든 개체가 당뇨병 유발 후에 소변  $\beta$ ig-h3 농도가 현저하게 증가함을 알 수 있었다(도 14 참조). 당뇨병 유발 5일에는 혈중 요소(urea)와 크레아틴 수치는 정상이며 신장의 조직소견도 뚜렷한 이상을 나타내지 않는다. 따라서, 5일째 소변에서  $\beta$ ig-h3 수치가 현저하게 증가한다는 것은 기존의 검사법으로는 찾아낼 수 없는 신장의 미세한 손상을 조기에 반영할 수 있다는 것을 시사한다.

<94> 또한, 본 발명에서는 신장이식 수술 전과 후의 환자의 소변으로부터  $\beta$ ig-h3의 농도를 측정하여 신장손상과  $\beta$ ig-h3 농도와의 상관관계를 확인하고자 하여 보면, 신장이식 수술 전 높은 수치의  $\beta$ ig-h3 농도가 수술이 성공적으로 된 환자의 경우에 있어서 서서히 떨어지는 것을 보였고, 수술 후에 신장 기능이 회복되지 않은 5번 환자의 경우에는 계속 높은 수치를 유지하였다(표 2 참조). 상기 결과로부터 본 발명의  $\beta$ ig-h3의 농도가 신장의 손상을 예민하게 반영함을 알 수 있다.

<95> 또한, 본 발명에서는 신부전증 환자의 소변을 채취하여  $\beta$ ig-h3의 농도를 측정한 결과, 모든 환자에서 정상보다 현저히 높은  $\beta$ ig-h3 농도 수치를 보임을 확인하여 보면, 소변에서의  $\beta$ ig-h3 농도는 신장의 손상을 조기에 예민하게 반영하며 신장의 손상을 주는 여러 경우에서 진단적으로 대단히 중요한 의미를 가짐을 확인하였다(표 3 참조).

<96> 만성간염환자가 간경화로 진행하고 있는가를 판정하는 것은 임상적으로 대단히 중요하지만 현재까지는 그러한 진단법이 없는 실정이다. 간경화의 진행에 가장 중요한 인자는 TGF- $\beta$  이므로 TGF- $\beta$ 에 의해 발현이 유도되는  $\beta$  ig-h3가 간경화가 진행됨에 따라, 혈중에서 그 농도가 증가할 가능성이 있으며 이는 간경화의 진행정도를 반영할 수 있다. 실제로 간염환자의 간조직의 면역조직검사에서  $\beta$  ig-h3가 간경화의 정도가 심할수록 많이 발현됨을 확인하였다. 이에, 본 발명에서는 만성간염환자를 조직검사 결과를 기준으로 등급(grade)과 단계(stage)로 나누어 혈중  $\beta$  ig-h3 농도와의 상관관계를 확인하여 보면, 만성간염환자는 정상보다 혈중  $\beta$  ig-h3 농도가 높음을 확인하였으며, 낮은 등급과 단계에서의  $\beta$  ig-h3 농도가 높은 등급과 단계에서의  $\beta$  ig-h3 농도보다 높은 것을 확인하였다(표 5 참조). 등급 3과 단계 3은 간경화로 상당히 진행된 상태로서 이미 간경화의 활동성이 정점을 지난 상태라고 할 수 있으며, 반면에 단계 1과 2 및 등급 1과 2는 현재 염증반응이 활발히 진행하고 있는 활동성 상태라고 할 수 있다. 따라서, 혈중  $\beta$  ig-h3의 농도는 간경화의 활동성 상태를 반영하며, 동일한 환자에서 정기적으로 혈중  $\beta$  ig-h3 농도를 측정함으로써 환자의 간경화로의 진행 상황을 관찰할 수 있음을 알 수 있다.

<97> 또한, 퇴행성 관절염(osteoarthritis)과 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis) 환자의 활막액에서  $\beta$  ig-h3의 농도를 측정하여 보면, 류마티스성 관절염 환자의 활막액에서 약 2 배 정도의 높은  $\beta$  ig-h3 농도를 나타내었으며, 상기 결과로부터 활막액에서의



$\beta$ ig-h3 농도가 퇴행성 관절염과 류마티스성 관절염의 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다(표 6 참조).

<98> 따라서, 본 발명의  $\beta$ ig-h3 단백질을 정량하는 진단키트는 신장 질환, 간 질환 및 류마티스 질환을 조기에 예민하게 진단할 수 있고, 상기 질환의 진단, 손상 정도 및 진행 정도를 반영하기 때문에 효과적인 검사 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

<99> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<100> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<101> <실시예 1> 표준단백질 및 1차 항체의 제조

<102> <1-1> 인간  $\beta$ ig-h3 및 마우스  $\beta$ ig-h3의 분리

<103> 본 발명자들은 인간과 마우스의  $\beta$ ig-h3 단백질을 제조하였다. 각 단백질 구성 요소의 개략도를 도 1에 나타내었으며, 도 1에서 해칭된 칸과 크로스 해칭된 칸은 반복되는 도메인인 I, II, III, IV의 매우 보존된 서열을 나타내며, RGD 모티프는 빈칸으로 나타내었다.

<104> 본 발명자들은 pBluescript SK(-) 벡터에 클로닝된 서열번호 2로 기재되는 염기 서열을 가지는  $\beta$ ig-h3 cDNA(pBS  $\beta$ ig-h3)(인간 피부의 유두종 세포 cDNA로부터 클로닝하여 얻음)를

*Nde* I과 *Bgl* II 제한효소로 절단하여 블런트 말단(blunt end)을 가지는 DNA 단편을 제조하였고, 상기 단편을 pET-29 $\beta$  벡터(Novagen사에서 구입)의 *EcoR* V와 *EcoR* I 부위에 서브 클로닝하였다.  $\beta$ ig-h3의 69 아미노산에서 653 아미노산에 해당하는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 분리하였고 이를 인간  $\beta$ ig-h3라 명명하였다.

<105> 다음으로 본 발명자들은  $\beta$ ig-h3 cDNA에 *BamH* I과 *Xho* I부위를 만들어 상기와 동일한 방법으로 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하여 23 아미노산에서 641 아미노산에 해당하는 염기서열을 갖는 서열번호 4로 기재되는 DNA 단편을 제조하였고, 상기 단편을 pET-29 $\beta$  벡터의 *BamH* I과 *Xho* I 부위에 삽입하여 발현시킨 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 분리하였으며, 이를 마우스  $\beta$ ig-h3라 명명하였다.

<106> 본 발명자들은 상기 인간  $\beta$ ig-h3 단백질 및 마우스  $\beta$ ig-h3 단백질을 발현시키기 위하여, *E.coli* BL21(DE3)을 숙주로 사용하여 형질전환시켰고, 형질전환 균주들을 595 nm 에서의 광학농도(OD)가 0.5 내지 0.6이 될 때까지 37°C, 50  $\mu$ g/ml의 카나마이신(kanamycin)을 포함한 LB 배지에서 배양하였다. 배양과정에서 1 mM IPTG(isopropyl- $\beta$ -D(-)-thiogalactopyranoside)로 37°C에서 3시간 동안  $\beta$ ig-h3 단백질을 유도하여 발현시켰다.

<107>  $\beta$ ig-h3를 발현시킨 후 대장균 침전물(pellet)을 50 mM 트리스염산(Tris-HCl, pH 8.0), 100 mM 염화나트륨, 1 mM EDTA, 1% 트리톤(Triton) X-100, 1 mM 페닐메탄-설포닐

플루오라이드(phenylmethane sulfonyl fluoride, 이하 "PMSF" 라 함) 및 0.5 mM DTT로 구성된 세포 용해 완충용액(cell lysis buffer)에 다시 현탁시킨 후 초음파처리를 하여 세포를 파쇄하였으며, 이 과정을 5 회 반복하였다.

<108>        상기의 용액을 원심분리하여  $\beta$ ig-h3이 포함된 불용성 함유체(inclusion bodies)를 0.5 M 염화나트륨, 5 mM 이미다졸(imidazol) 및 8 M 요소(urea)를 포함하는 20 mM 트리스염산(Tris-HCl) 완충용액에 용해시킨 후, Ni-NTA 레진(Qiagen)을 사용하여 단백질을 정제하였다. 50 mM 염화나트륨을 포함하는 20 mM 트리스 염산 완충용액에서 고농도부터 저농도까지의 요소(urea)로 단백질을 차례대로 투석하여 정제하였고 SDS-PAGE로 확인하였다.

<109>        그 결과, 본 발명의 인간  $\beta$ ig-h3 및 마우스  $\beta$ ig-h3 단백질이 분리됨을 확인하였다(도 2).

<110> <1-2>    $\beta$ ig-h3 D-IV(1x) 및  $\beta$ ig-h3 D-IV(4x)의 제조 및 분리

<111>        본 발명자들은 서열번호 1로 기재되는 인간  $\beta$ ig-h3의 498부터 637까지의 제 4 도메인을 코딩하는 서열번호 6로 기재되는 DNA 단편을 PCR을 수행하여 증폭한 후 pET-29 $\beta$  벡터에 클로닝한 제 4 도메인의 발현 벡터를 제조하였고, 이를 " $\beta$ ig-h3 D-IV"라 명명하였다.

<112>        다음으로, 제 4 도메인에 해당하는 염기서열을 PCR로 합성하여 클레나우(Klenow) 단편으로 3' 말단 부분을 평활화시킨 후, 상기에서 제조한 네 번째 도메인을 포함하는

발현벡터 p $\beta$ ig-h3 D-IV의 *EcoR* V 부위에 삽입하였고 이를 p $\beta$ ig-h3 D-IV(2x)라 명명하였다. p $\beta$ ig-h3 D-IV(2x)의 삽입절편을 *EcoR* V와 *Xho* I으로 잘라낸 후, 상기와 동일한 방법으로 Klenow 단편으로 3' 말단 부분을 평활화시킨 후, p $\beta$ ig-h3 D-IV 및 p $\beta$ ig-h3 D-IV(2x)의 *EcoR* V 부위로 각각 삽입하였고, 이를 p $\beta$ ig-h3 D-IV(3x) 및 p $\beta$ ig-h3 D-IV(4x)로 명명하였다(도 3). Ni-NTA 레진(Qiagen)을 사용하여 발현되는 단백질을 정제하기 위하여 상기 DNA 단편의 카르복식 말단에 6 개의 히스티딘(histidine) 잔기를 연결시켜 His-표지(His-tag)를 만들었다.

<113> 상기 발현 벡터를 대장균 BS21(DE3)에 형질전환시킨 후 대장균 형질전환체를 50  $\mu$ g/ml 농도의 카나마이신(kanamycin)이 첨가된 배지에서 배양하였다. 상기 대장균 형질전환체를 1 mM Tris-HCL(pH 8.0), 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF 및 0.5 mM DTT를 포함하는 세포용해 완충용액에 현탁시킨 후 초음파처리를 하여 세포를 파쇄하였다. 상기 과정을 5회 반복한 후 원심분리로 상등액을 분리하였고 이 상등액을 Ni-NTA 레진이 충전된 컬럼을 사용하여 정제한 후 SDS-PAGE를 사용하여 확인하였다.

<114> 그 결과, 본 발명의 제 4 도메인을 포함하는 각각 서열번호 7 내지 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는  $\beta$ ig-h3 D-IV(1x),  $\beta$ ig-h3 D-IV(2x),  $\beta$ ig-h3 D-IV(3x) 및  $\beta$ ig-h3 D-IV(4x) 단백질이 발현됨을 확인하였다(도 4).

<115> <1-3> 일차 항체의 제조 및 분리

<116> 상기 실시예 <1-1>에서 분리한 인간  $\beta$ ig-h3 및 마우스  $\beta$ ig-h3 단백질을 항원으로 사용하여 토끼의 등에 피하주사하여 항체를 제조하였다. 처음 주사는 200  $\mu$ g의 단백

질을 완전 프레운드 면역증강제(complete Freund's adjuvant)와 혼합하여 주사하였고 그 다음의 4회에 걸친 주사는 100  $\mu$ g의 단백질을 불완전 프레운드 면역증강제(incomplete Freund's adjuvant)와 혼합하여 3주 간격으로 주사하였다. 혈청은 채혈 후 상온에서 2시간 정도 방치한 후 10,000  $\times$ 에서 10분간 원심분리하여 일차항체를 포함하는 상등액을 취하였고,  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하여 사용하였다(도 5).

<117> <실시예 2> 인간  $\beta$ ig-h3 단백질의 코팅농도 및 항체의 정량적 비율 결정

<118> <2-1> 1차 항체의 정량적 비율 결정

<119> 인간  $\beta$ ig-h3 단백질에 대한 일차항체의 정량적 비율을 구하기 위하여 인간  $\beta$ ig-h3를 0.5  $\mu$ g/ml의 코팅완충용액(20 mM carbonate-bicarbonate 용액, pH 9.6, 0.02% sodium azide)에 희석한 후, 96-웰 플레이트에 200  $\mu$ l씩 넣고,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 코팅하였다. 코팅된 플레이트에 일차 항 인간  $\beta$ ig-h3 항체의 농도를 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:2000 및 1:3200으로 희석완충용액(살린-인산 완충용액/트윈 80)에 희석한 후, 1:5000으로 고정시킨 이차항체를 첨가하여 상온에서 1시간 반 동안 반응시켰다. 반응 후 기질용액(o-페닐렌디아민을 메탄올에 10 mg/ml로 녹여 증류수에 1:100으로 희석하고 30% 과산화수소 10  $\mu$ l를 첨가하여 혼합)을 첨가하고, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 50  $\mu$ l의 8 N 황산용액으로 반응을 중지시키고 바로 ELISA 분석(O.D 492 nm)을 실시하였다.

<120> 그 결과, 일차 항 인간  $\beta$ ig-h3 항체의 정량적 비율은 1:1600과 1:2000일 때 그래프가 직선을 이루게 되므로 상기 비율이 가장 적당함을 확인하였다(도 7).

<121> <2-2> 2차 항체의 정량적 비율 결정

<122> 이차항체의 정량적 비율을 구하기 위하여 인간  $\beta$  ig-h3 단백질을  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 코팅하고, 일차 항 인간  $\beta$  ig-h3 항체를 1:1600과 1:2000으로 희석하여 고정시킨 후 이차항체의 농도를 각각 1:1000, 1:2000 및 1:3000으로 희석하여 ELISA 분석을 실시하였다.

<123> 그 결과, 1:2000의 비율일 때 그래프가 직선을 이루게 되므로 상기 비율이 가장 적당한 비율임을 확인하였다(도 8).

<124> <2-3> 인간  $\beta$  ig-h3 단백질의 코팅 농도 결정

<125> 본 발명자들은 인간  $\beta$  ig-h3 단백질의 코팅 농도를 결정하기 위하여 일차 항 인간  $\beta$  ig-h3 항체를 1:2000, 이차항체를 1:2000으로 희석하였고, 인간  $\beta$  ig-h3 단백질의 코팅 농도를  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  및  $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하여 ELISA 분석을 실시하였다.

<126> 그 결과  $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 과  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  두 가지 경우 모두 그래프가 직선을 나타내어 정량적 범위로 적당하였지만  $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 보다  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 피어슨의 곱 모멘트 상관 계수( $R^2$ )값이 1에 가까운 형태로 나타나서, 코팅 농도는  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 가장 적당함을 확인하였다(도 9).

<127> 상기 결과로부터, 본 발명자들은 인간  $\beta$  ig-h3 표준단백질의 코팅 농도를  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하고 일차 항 인간  $\beta$  ig-h3 항체 및 이차항체의 희석 비율은 각각 1:2000으로 하여 정량적 실험을 수행하였다.

<128> 상기 결과를 바탕으로 하기 수학식 1로 표시되는 로바드(Robard, 1971)의 공식에 의해 로그 변환(log transformation)시킨 결과, 11 ng/ml에서 900 ng/ml까지 직선을 형성하여 상기 범위가 측정가능범위임을 확인하였고, 상기 반응 조건이 10 ng/ml까지 측정할 수 있는 감도를 가지고 있음을 확인하였다(도 10).

<129> 【수학식 1】  $\log b = \log e^{b/(100-b)}$

<130> 상기에서 b는 항원이 들어 있지 않는 웰의 흡광도에 대한 각 농도에서의 퍼센트 값을 나타낸다.

<131> <실시예 3> 교차실험을 통한 마우스  $\beta$ ig-h3, 재조합  $\beta$ ig-h3 D-IV(1x) 및  $\beta$ ig-h3 D-IV(4x) 단백질의 정량적 범위측정

<132> 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 마우스  $\beta$ ig-h3, 재조합  $\beta$ ig-h3 D-IV(1x) 및  $\beta$ ig-h3 D-IV(4x)를 사용하여 단백질의 농도, 일차항체 및 이차항체의 정량적 비율을 결정하였다. 구체적으로, 각 단백질의 코팅 농도를 0.5  $\mu$ g/ml로 하고, 일차 항 인간  $\beta$ ig-h3 항체 및 이차항체는 1:2000으로 하여 정량적 실험을 하였으며, 또한 일차 항 마우스  $\beta$ ig-h3 항체 및 이차항체는 1:2000으로 하여 정량적 실험을 하였다.

<133> 그 결과, 모든 경우에 있어서 그래프가 직선을 형성하였고, 측정범위 역시 11 ng/ml에서 900 ng/ml로 서로 비슷함을 확인하였다(도 11 및 도 12).

<134> 상기의 결과로부터, 표준단백질은 인간  $\beta$ ig-h3, 마우스  $\beta$ ig-h3, 재조합  $\beta$ ig-h3 D-IV(1x) 및  $\beta$ ig-h3 D-IV(4x) 중 어느 것을 사용해도 무방하며, 일차항체의 경우도 교차작용이 있으므로 항 인간  $\beta$ ig-h3 항체나 항 마우스  $\beta$ ig-h3 항체 중 어느 것을 사용해도 됨을 확인하였다.

<135> <실시에 4> 신장 질환과  $\beta$ ig-h3 발현과의 상관관계

<136> <4-1> 당뇨병 환자에서의  $\beta$ ig-h3 측정

<137> 본 발명자들은 신장 질환의 병리기전에 중요한 역할을 하는 TGF- $\beta$ 에 의해  $\beta$ ig-h3의 발현이 강력하게 유도된다는 점에 착안하여 신장 질환과  $\beta$ ig-h3 발현과의 상관관계를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 본 발명자들은 먼저 신장 질환을 일으키는 대표적인 질환인 당뇨병 환자를 상대로 소변에서의  $\beta$ ig-h3를 측정하였다. 구체적으로 당뇨병 환자의 소변 110  $\mu$ l와 일차항체(1:1000) 110  $\mu$ l를 둥근 플레이트에 첨가하여 37°C에서 1시간 반 동안 배양한 후, 그 중 200  $\mu$ l를 다시  $\beta$ ig-h3로 미리 코팅된 플레이트에 첨가하여 상온에서 30분 동안 반응시킨다. 반응 후, 이차항체-기질 반응중지액으로 반응을 중지시켜 ELISA 분석(O.D 492 nm)을 수행하였다.

<138> 【표 1】

신장 질환 환자의 소변  $\beta$ ig-h3 농도

대상군	$\beta$ ig-h3(ng/ml)
정상	31.0 (n=93, $\pm$ 8.6)
Type II DM	101.9 (n=51, $\pm$ 17.1)
Type II DM + microalbuminuria	127.4 (n=30, $\pm$ 27.7)
Type II DM + overt proteinuria	105.4 (n=19, $\pm$ 14.9)
Type II DM + CRF	153.6 (n=93, $\pm$ 28.1)



<139> 그 결과, 마이크로알부미누리아(microalbuminuria)를 포함하는 당뇨병성 신장 질환자의 소변  $\beta$ ig-h3의 농도는 정상인에 비해 5 배 정도의 높은 수치를 보였으며 임상적으로 당뇨병성 신장 질환을 나타내지 않는 환자에서도  $\beta$ ig-h3의 농도가 증가하였다. 당뇨병성 신장 질환을 가진 환자의 소변  $\beta$ ig-h3는 대부분의 환자에서 정상보다 높은 수치를 보였으며 임상적으로 신장질환이 없는 환자의 일부분도 높은 수치를 나타내었다. 상기의 결과로 볼 때 소변  $\beta$ ig-h3는 신장의 손상정도를 잘 반영한다고 할 수 있으며 특히 임상적으로 신장 질환을 나타내지 않는 당뇨병 환자의 일부에서도 높은 수치를 보이는 것은 이들 환자가 임상적으로 드러나는 뚜렷한 신장기능 장애는 없지만 어느 정도 신장의 손상을 입고 있다는 것을 의미한다. 따라서, 소변의  $\beta$ ig-h3 측정은 신장의 손상을 조기에 반영하는 감도가 높은 진단적 의의를 가지며, 기존의 신장기능을 반영하는 어떤 검사보다도 조기에 신장의 손상을 반영할 수 있음을 확인하였다.

<140> <4-2> 당뇨병 유발 동물 모델에서의  $\beta$ ig-h3 측정

<141> 본 발명자들은 소변에서의  $\beta$ ig-h3 농도가 당뇨병 환자의 신장 손상을 조기에 반영하는지를 확인하기 위하여, 당뇨병 유발 동물 모델에서  $\beta$ ig-h3 농도를 측정하였다.

<142> SD 래트(Sprague-Dawley rat)에 당뇨병 유발 약물인 스트렙토조토신(streptozotosin)을 60 mg/kg 농도로 복강 내에 주사하여 당뇨병을 유발하였고, 혈당을 측정하여 당뇨병이 유발된 것을 확인하였으며, 5일째의 소변을 24시간 동안 채취하여 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로  $\beta$ ig-h3 농도를 측정하였다.

<143> 그 결과, 당뇨병 유발 전의  $\beta$ ig-h3 농도는 56.9  $\pm$  6.4 ng/크레아틴 mg 이었으나 당뇨병 유발 후 5일째의 평균치는 230.4  $\pm$  31.8 ng/크레아틴 mg 으로써  $\beta$ ig-h3 농도가 약 4배 정도 증가하였다(도 13). 당뇨병이 유발된 후 각 개체에서의  $\beta$ ig-h3 농도 변화를 살펴보면 모든 개체가 당뇨병 유발 후에 소변  $\beta$ ig-h3 농도가 현저하게 증가함을 알 수 있었다(도 14). 당뇨병 유발 5일에는 혈중 요소(urea)와 크레아틴 수치는 정상이며 신장의 조직소견도 뚜렷한 이상을 나타내지 않는다. 따라서, 5일째 소변에서  $\beta$ ig-h3 수치가 현저하게 증가한다는 것은 기존의 검사법으로는 찾아낼 수 없는 신장의 미세한 손상을 조기에 반영할 수 있다는 것을 시사한다.

<144> <4-3> 신장이식(kidney transplantation) 수술환자에서의  $\beta$ ig-h3 측정

<145> 본 발명자들은 신장이식 수술 전과 후의 환자의 소변으로부터  $\beta$ ig-h3의 농도를 측정하여 신장손상과  $\beta$ ig-h3 농도와의 상관관계를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로 신장이식 수술 전과 후의 환자에서  $\beta$ ig-h3 농도를 측정하였고, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

<146> 【표 2】

신장이식 전후의 $\beta$ ig-h3 농도 변화														
일 환자	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	수술 정
1				376.9	199.2	105.6	59.1	67.6	84.5	63.1	61.2	39.7	9.9	O
2		149.2	147.3	133.5	159.5	148.3	147.3	96.0	74.0	40.7	20.3	27.9	26.4	O
3	107.8	95.8	101.4	102.3	102.2	106.1	106.6	125.5	83.5	49.4	36.5	33.3	23.2	O
4							298.8	208.1	140.5	169.9	188.4	76.3	24.4	O
5							188.6	160.7	469.3	290.9	494.7	324.4	-	X

<147> 그 결과, 신장이식 수술 전 높은 수치의  $\beta$  ig-h3 농도가 수술이 성공적으로된 환자의 경우에 있어서 서서히 떨어지는 것을 보였고, 수술 후에 신장 기능이 회복되지 않은 5번 환자의 경우에는 계속 높은 수치를 유지하였다. 상기 결과로부터 본 발명의  $\beta$  ig-h3의 농도가 신장의 손상을 예민하게 반영함을 알 수 있다.

<148> <4-4> 신부전증 환자에서의  $\beta$  ig-h3 측정

<149> 본 발명자들은 신부전증 환자의 소변을 채취하여 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로  $\beta$  ig-h3의 농도를 측정한 결과, 모든 환자에서 정상보다 현저히 높은  $\beta$  ig-h3 농도 수치를 보임을 확인하였다(표 3).

<150> 【표 3】

신부전증환자의 소변 $\beta$ ig-h3 농도	
대상군	$\beta$ ig-h3 (ng/mg)
정상	31.0 (n=93, $\pm 8.6$ )
만성신부전증	335.4 (n=9, $\pm 66.0$ )

<151> <4-5> 신장질환 관련 환자에서의  $\beta$  ig-h3 측정

<152> 본 발명자들은  $\beta$  ig-h3가 신장과 관련된 질환을 앓는 환자에서 정상과 다르게 발현되는지 알아보기 위하여, 신장이식 후 정상인 경우, 이식 받은 신장의 크기가 작은 경우, 만성 거부, 신우염의 재발 및 사이클로스포린 독성이 나타난 경우로 분류하여 상

기 환자의 소변으로부터  $\beta$ ig-h3의 농도를 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로 측정하였다.

<153> 그 결과, 신장 이식 후 정상적인 신장 기능을 보이는 환자의 평균치는 39.4 ng/크레아틴 mg 인 반면 만성거부, 신우염의 재발 및 사이클로스포린 독성이 있는 환자에서는  $\beta$ ig-h3의 농도가 현저히 증가하여 각각 140.8, 175.4 및 90.9 ng/크레아틴 mg을 나타내었다(도 15, 표 4).

<154> 【표 4】

$\beta$ ig-h3	신장이식 후 정상 (n=47)	이식받은 신장크기 작은 경우(n=16)	만성거부 (n=15)	신우염 재발 (n=6)	사이클로스포린 독성(n=6)
평균	39.4±8.2	54.7±3.0	140.8±1.1	175.4±5.8	90.9±2.4
최저	9.4	17.9	48.8	83.2	64.6
최대	84.7	100.0	374.4	249.8	119.4

<155> 또한, 본 발명자들은 신장이식후 재발에 의해  $\beta$ ig-h3 농도가 증가한 것이 치료에 반응함에 따라 다시 감소하는 가를 알아보았다. 신장 이식 후 신우염(국소분절사구체경화증)이 재발하여 혈장교환술을 받은 환자의 소변  $\beta$ ig-h3 농도는 점차 감소되는 것으로 나타났는데, 이는 치료에 반응함에 따라 소변의  $\beta$ ig-h3의 농도가 감소하는 것을 알 수 있는 것으로 치료반응의 지표로서 가능성을 나타내는 것이다(도 16).

<156> <4-6> 신장이식 후  $\beta$ ig-h3 농도에 미치는 영향 분석

<157> 본 발명자들은 신장이식 수술 후에 소변  $\beta$ ig-h3의 농도가 어떻게 변하는지 알아보기 위하여, 신장수술 직후 매일 소변에서  $\beta$ ig-h3의 농도를 측정하였다.

<158> 그 결과, 살아있는 사람의 신장이나 뇌사한 사람의 신장을 이식 받아 성공적으로 이식이 된 경우 소변  $\beta$ ig-h3의 농도가 수술 후 서서히 감소하여 살아있는 사람의 신장을 이식 받은 경우는 4에서 5일 사이에 정상값으로 돌아오며 뇌사한 사람의 신장이식인 경우 6에서 7일 사이에 정상값이 되었다(도 17).

<159> 또한, 이식한 신장의 크기가 작아서 이식된 신장은 정상이지만 신기능이 충분하지 않은 경우는 혈중 크레아틴 값은 여전히 높은 반면 소변  $\beta$ ig-h3의 농도는 정상으로 돌아왔다. 이는 이식된 신장이 작아서 환자의 노폐물을 충분히 다 걸러내지는 못하지만 신장 자체는 정상임을 의미하고 따라서 신장의 손상을 반영하는  $\beta$ ig-h3의 농도는 정상으로 돌아왔다는 것을 의미한다(도 17). 반면 신장이식이 실패한 경우 소변  $\beta$ ig-h3 농도의 변동이 심하게 나타나는 경향을 보여주었다.

<160> 이상의 결과들로 볼 때 소변  $\beta$ ig-h3 농도의 측정은 신장의 손상정도를 잘 반영하여 신장 질환 이상의 조기 진단과 신장질환의 진행과 치료 효과 판정의 좋은 지표로서 사용될 수 있다.

<161> 상기의 결과로부터, 소변에서의  $\beta$ ig-h3 농도는 신장의 손상을 조기에 예민하게 반영하며 신장의 손상을 주는 여러 경우에서 진단적으로 대단히 중요한 의미를 가짐을 확인하였다.

<162> <실시에 5> 간 질환과  $\beta$ ig-h3 발현과의 상관관계

<163> 만성간염환자가 간경화로 진행하고 있는가를 판정하는 것은 임상적으로 대단히 중요하지만 현재까지는 그러한 진단법이 없는 실정이다. 간경화의 진행에 가장 중요한 인자는 TGF- $\beta$  이므로 TGF- $\beta$ 에 의해 발현이 유도되는  $\beta$ ig-h3가 간경화가 진행됨에 따라 혈중에서 그 농도가 증가할 가능성이 있으며 이는 간경화의 진행정도를 반영할 수 있다. 실제로 간염환자의 간조직의 면역조직검사에서  $\beta$ ig-h3가 간경화의 정도가 심할수록 많이 발현된다고 알려져 있다. 이에, 본 발명자들은 만성간염환자를 조직검사 결과를 기준으로 등급(grade)과 단계(stage)로 나누어 혈중  $\beta$ ig-h3 농도와의 상관관계를 확인하였다.

<164> 만성간염환자의 혈액을 채혈하여 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로  $\beta$ ig-h3의 농도를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

## &lt;165&gt; 【표 5】

만성간염환자의 혈중 $\beta$ ig-h3 농도			
등급	$\beta$ ig-h3 (ng/mg)	단계	$\beta$ ig-h3 (ng/mg)
0(정상)	146.2 (n=172, $\pm$ 28.5)	0(정상)	146.2 (n=172, $\pm$ 28.5)
1	196.6 (n=16, $\pm$ 30.6)	1	193.4 (n=20, $\pm$ 30.2)
2	190.0 (n=43, $\pm$ 72.8)	2	192.2 (n=36, $\pm$ 79.1)
3	167.5 (n=7, $\pm$ 21.9)	3	172.5 (n=10, $\pm$ 21.9)

<166> 그 결과, 만성간염환자는 정상보다 혈중  $\beta$ ig-h3 농도가 높음을 확인하였으며, 낮은 등급과 단계(1 및 2)에서의  $\beta$ ig-h3 농도가 높은 등급과 단계(3)에서의  $\beta$ ig-h3 농도보다 높은 것을 확인하였다. 등급 3과 단계 3은 간경화로 상당히 진행된 상태로서 이미

간경화의 활동성이 정점을 지난 상태라고 할 수 있으며, 반면에 단계 1과 2 및 등급 1과 2는 현재 염증반응이 활발히 진행하고 있는 활동성 상태라고 할 수 있다. 따라서, 혈중  $\beta$ ig-h3의 농도는 간경화의 활동성 상태를 반영하며, 동일한 환자에서 정기적으로 혈중  $\beta$ ig-h3 농도를 측정함으로써 환자의 간경화로의 진행 상황을 관찰할 수 있음을 알 수 있다.

<167> <실시예 6> 류마티스 관절염 환자와  $\beta$ ig-h3 발현과의 상관관계

<168> 본 발명자들은 퇴행성 관절염(osteoarthritis)과 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis) 환자의 활막액에서 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로  $\beta$ ig-h3의 농도를 측정하였다(표 6).

<169> 【표 6】

활막액에서의  $\beta$ ig-h3 농도

	$\beta$ ig-h3 (ng/mg)
퇴행성관절염	11.0 (n=29, $\pm 6.3$ )
류마티스성관절염	21.0 (n=20, $\pm 2.5$ )

<170> 그 결과, 류마티스성 관절염 환자의 활막액에서 약 2 배 정도의 높은  $\beta$ ig-h3 농도를 나타내었으며, 상기 결과로부터 활막액에서의  $\beta$ ig-h3 농도가 퇴행성 관절염과 류마티스성 관절염의 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

## 【발명의 효과】

<171>      상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의  $\beta$ ig-h3 측정법은 인간  $\beta$ ig-h3, 마우스  $\beta$ ig-h3,  $\beta$ ig-h3 D-IV(1x) 또는  $\beta$ ig-h3 D-IV(4x)를 표준단백질로 사용하므로 비용이 저렴하고 다양한 체액에서  $\beta$ ig-h3의 농도를 정확하게 진단할 수 있으며, 검체에서의  $\beta$ ig-h3 농도는 TGF- $\beta$ 와 관련되는 의학적 증상들인 여러 가지 신장 질환, 간질환 및 류마티스 질환을 조기에 예민하게 반영하므로 상기 질환의 진단, 손상 정도 및 진행 정도를 반영하는 효과적인 검사 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.



**【특허청구범위】****【청구항 1】**

- 1)  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질을 제조하는 단계(단계 1);
- 2) 상기 단계 1의 단백질에 대한 항체를 제조하는 단계(단계 2); 및
- 3) 상기 단계 1의 단백질 및 단계 2의 항체를 항원-항체 반응을 이용한 정량방법에 사용하여 피검시료 중에 포함된  $\beta$ ig-h3 단백질의 양을 측정하는 단계(단계 3)를 포함하는  $\beta$ ig-h3의 정량방법.

**【청구항 2】**

제 1항에 있어서, 상기 항원-항체 반응을 이용한 정량방법은 면역블롯팅, 면역침전법, ELISA 방법, RIA(Radioimmuno assay), 단백질칩, 래피드 어세이(rapid assay) 및 마이크로어레이(microarray)로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법을 사용하는 것을 특징으로 하는 정량방법.

**【청구항 3】**

제 1항에 있어서, 상기 단계 3의  $\beta$ ig-h3 단백질의 양을 측정하는 것은

- 1)  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질을 기질에 코팅시키는 단계(단계 1);
- 2) 상기 단계 1의 단백질에 대한 항체를 피검시료와 반응시키는 단계(단계 2);

3) 단계 1의 흡착된 단백질에 단계 2의 반응물을 첨가하여 반응시킨 후 세척하는 단계(단계 3); 및

4) 단계 3의 반응물에 2차 항체를 첨가하여 반응시키고 흡광도를 측정하는 단계(단계 4)를 포함하는 것을 특징으로 하는 정량방법.

【청구항 4】

제 1항 내지 제 3항에 있어서, 상기  $\beta$ ig-h3 단백질은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 인간  $\beta$ ig-h3 단백질 또는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 마우스  $\beta$ ig-h3 단백질인 것을 특징으로 하는 정량방법.

【청구항 5】

제 1항 내지 제 3항에 있어서, 상기  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인은  $\beta$ ig-h3 단백질의 4번째 파스-1 도메인을 1개 또는 2개 내지 10개를 반복하여 연결한 것을 특징으로 하는 정량방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인은 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 정량방법.

## 【청구항 7】

제 1항에 있어서, 상기 피검시료는 신장 질환, 간 질환 또는 류마티스 환자의 소변, 혈액 또는 활막액을 포함하는 인체의 모든 체액인 것을 특징으로 하는 정량방법.

## 【청구항 8】

$\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 재조합 단백질 및  $\beta$ ig-h3 단백질 또는  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인에 대한 항체를 포함하는 신장 질환, 간 질환 또는 류마티스 질환에 대한 진단키트.

## 【청구항 9】

제 8항에 있어서, 완충용액, 2차 항체, 세척액, 반응정지액 또는 발색기질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진단키트.

## 【청구항 10】

제 8항에 있어서, 상기  $\beta$ ig-h3 단백질은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 인간  $\beta$ ig-h3 단백질 또는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 마우스  $\beta$ ig-h3 단백질인 것을 특징으로 하는 진단키트.

【청구항 11】

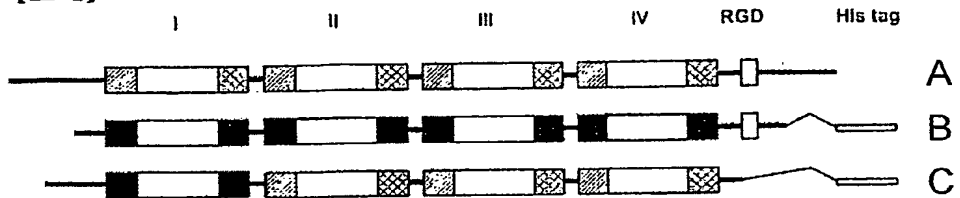
제 8항에 있어서, 상기  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인은  $\beta$ ig-h3 단백질의 4번째 파스-1 도메인을 1개 또는 2개 내지 10개를 반복하여 연결한 것을 특징으로 하는 진단키트.

【청구항 12】

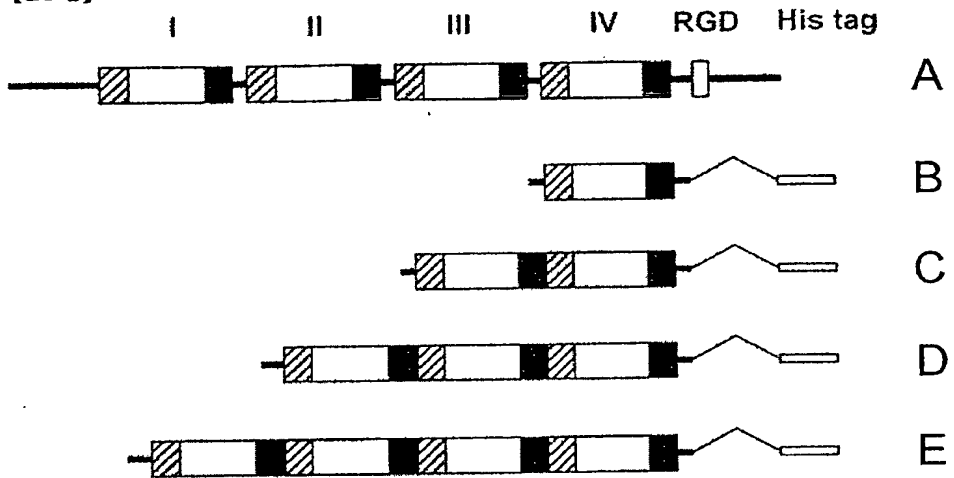
제 11항에 있어서, 상기  $\beta$ ig-h3의 파스-1 도메인은 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 진단키트.

## 【도면】

【도 1】



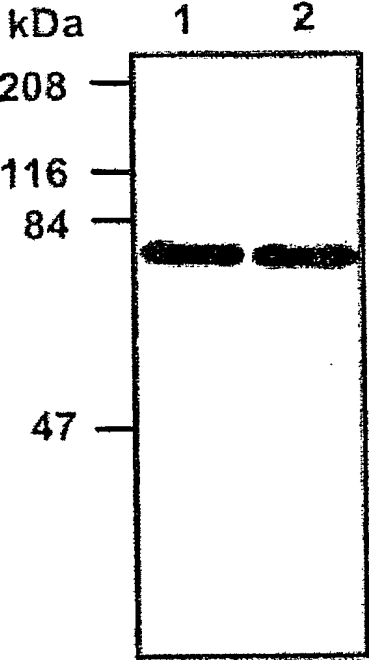
【도 2】



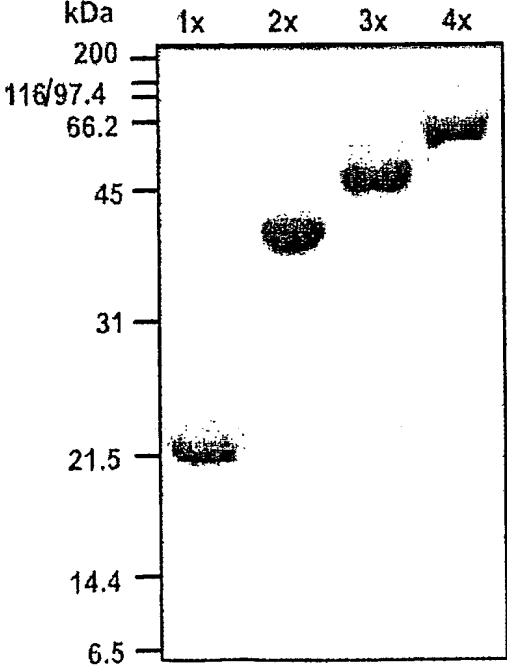
0021488

출력 일자: 2002/11/12

【도 3】



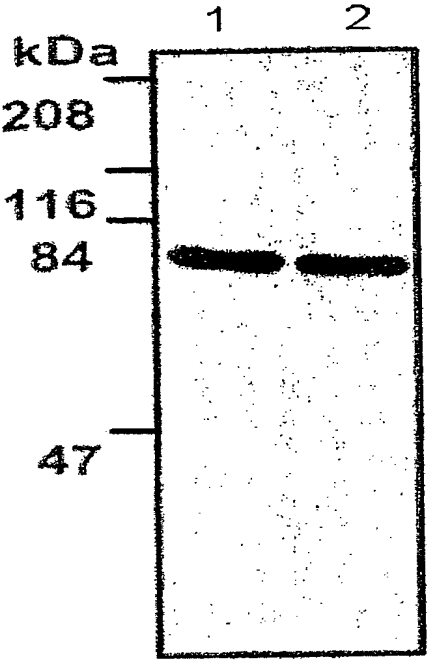
【도 4】



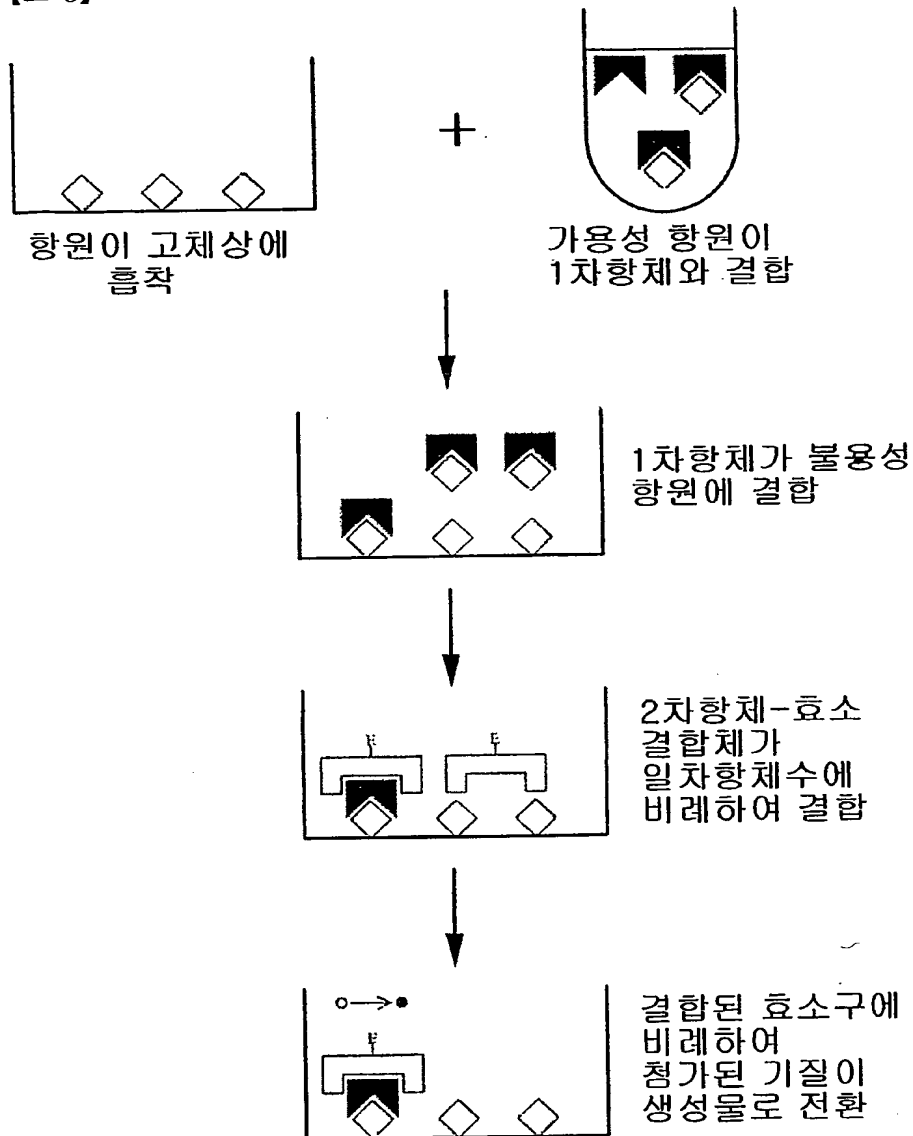
0021488

출력 일자: 2002/11/12

[도 5]



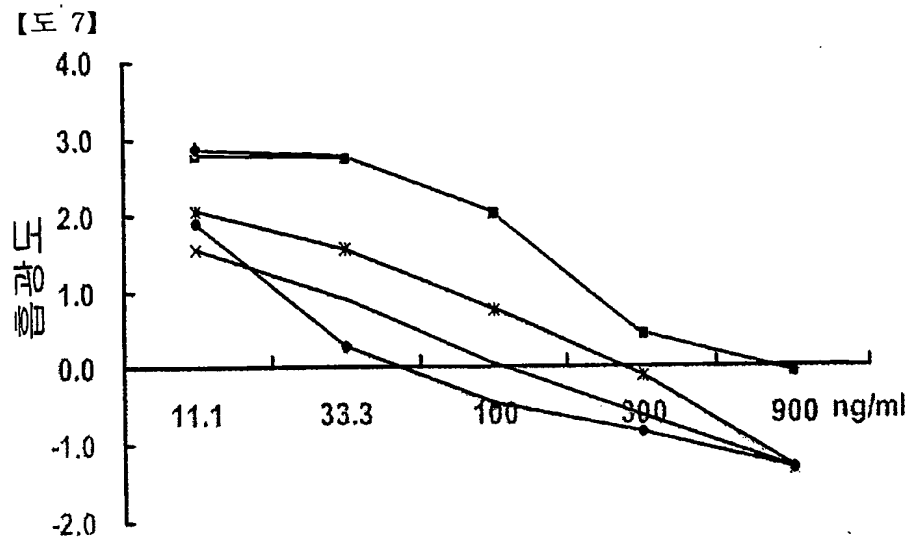
【도 6】





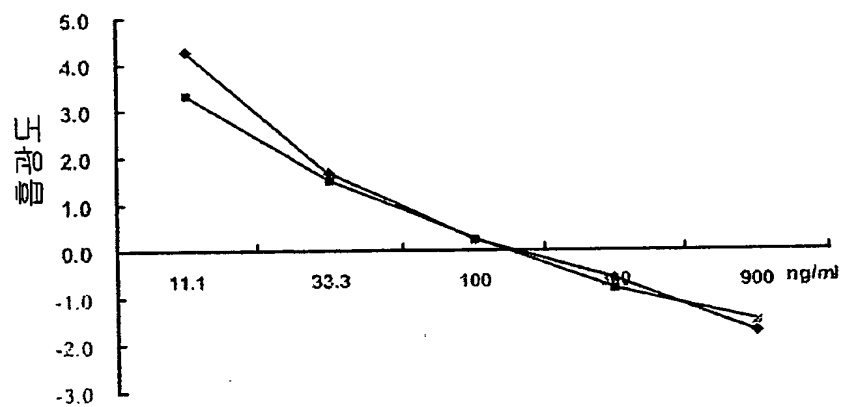
20021488

출력 일자: 2002/11/12

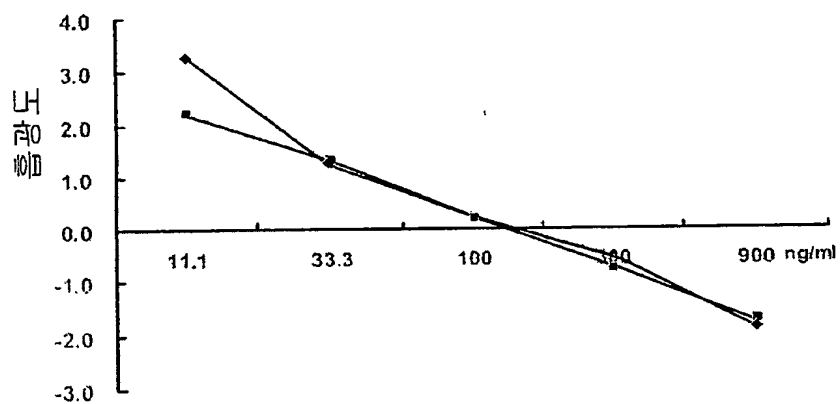


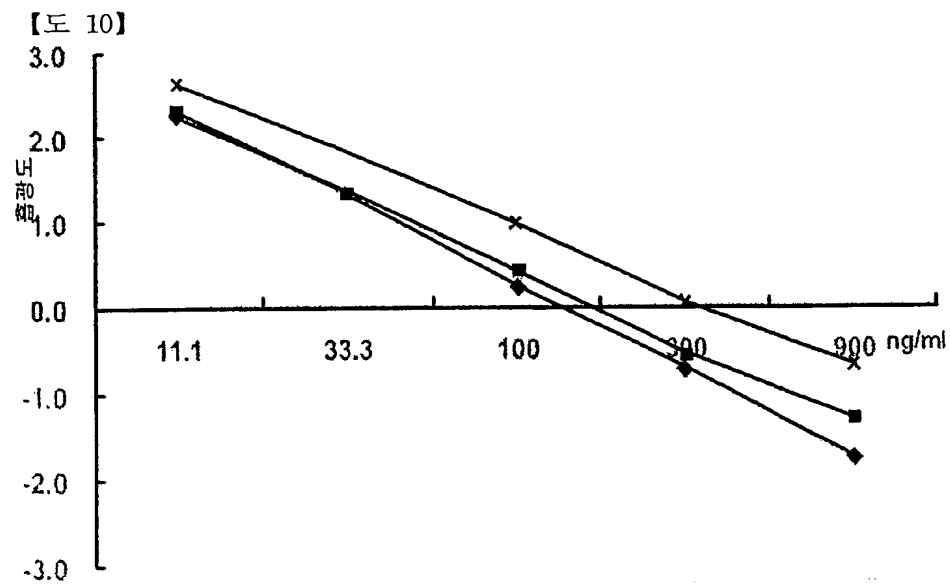
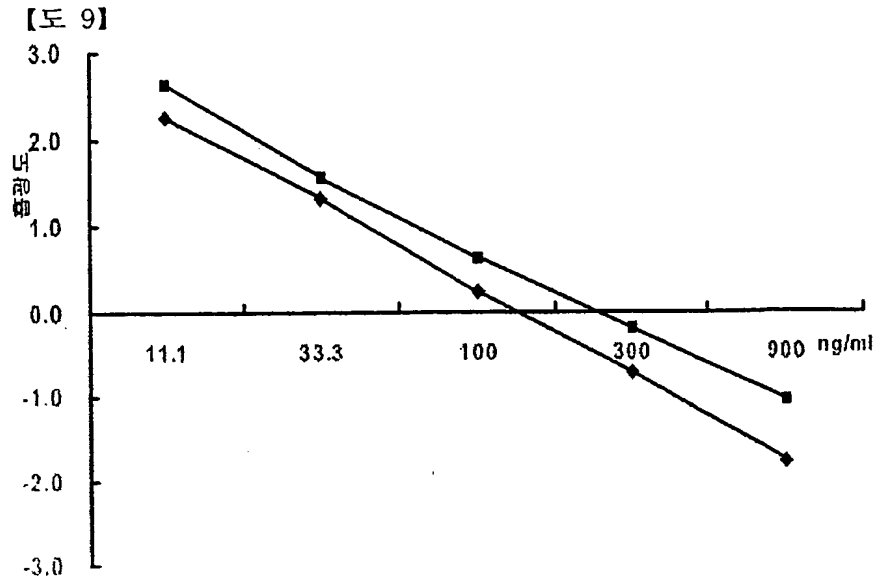
【도 8】

A



B



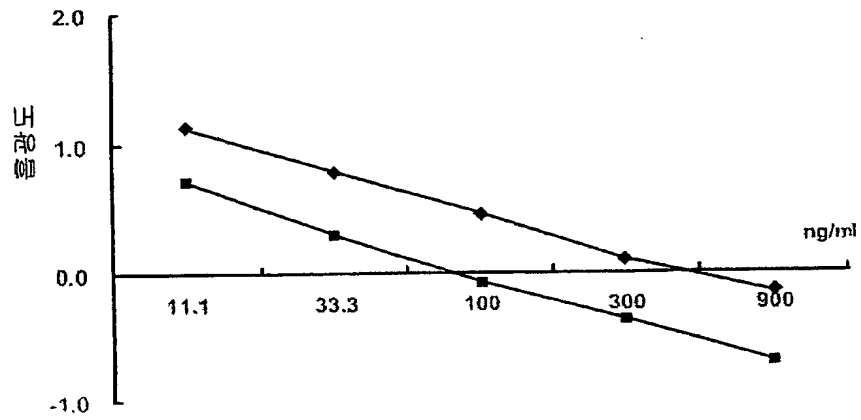


0021488

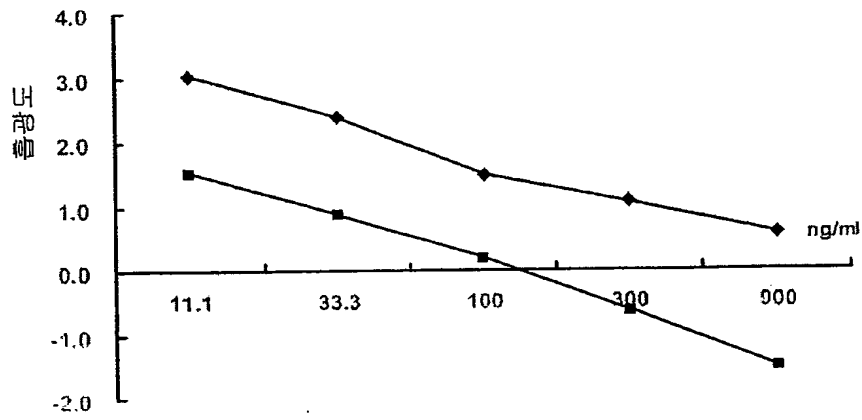
출력 일자: 2002/11/12

【도 11】

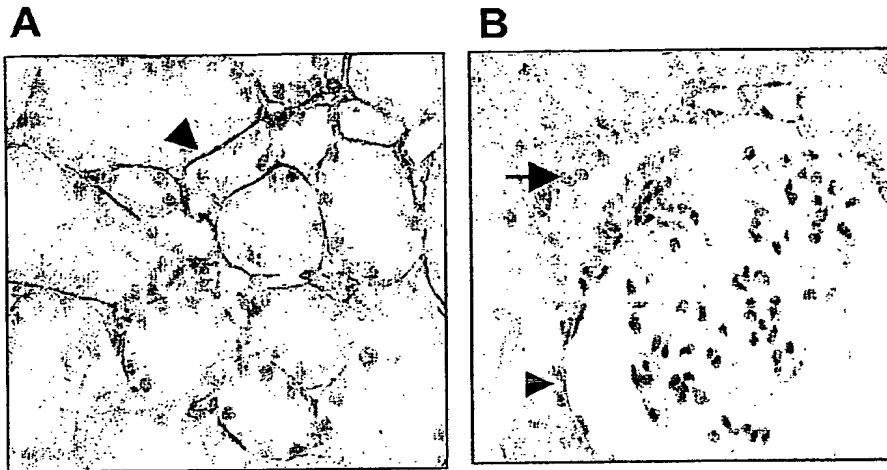
A



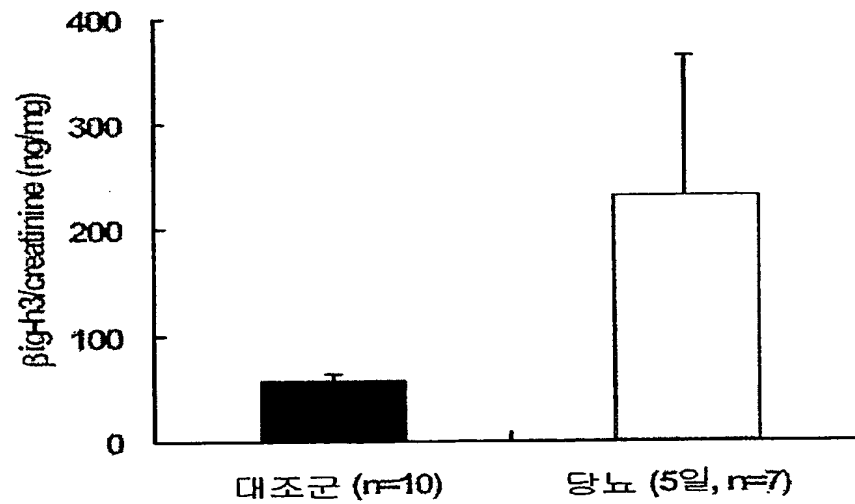
B



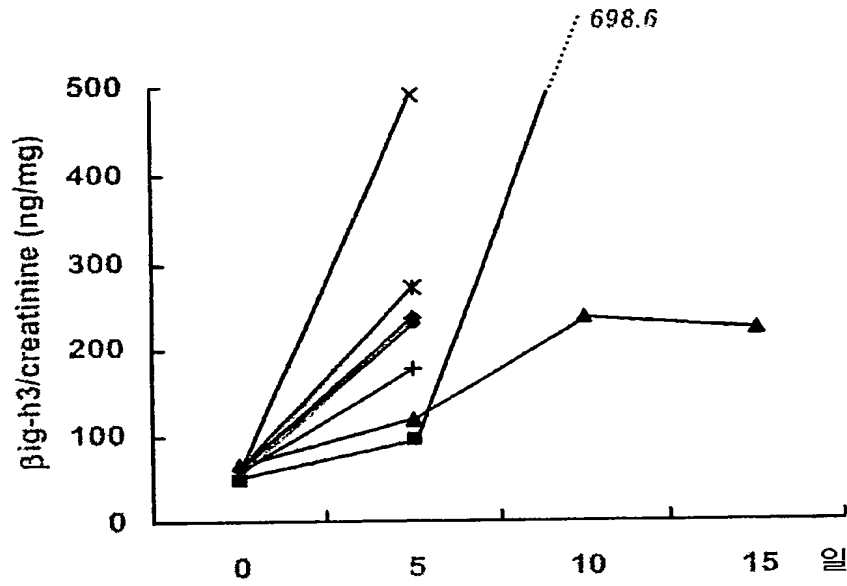
【도 12】



【도 13】

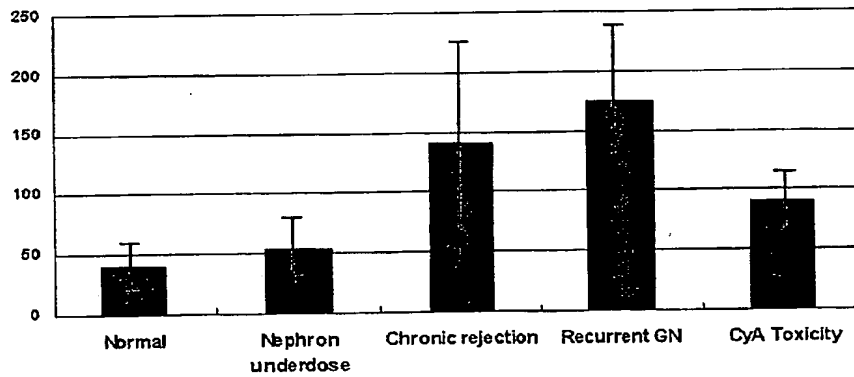


【도 14】

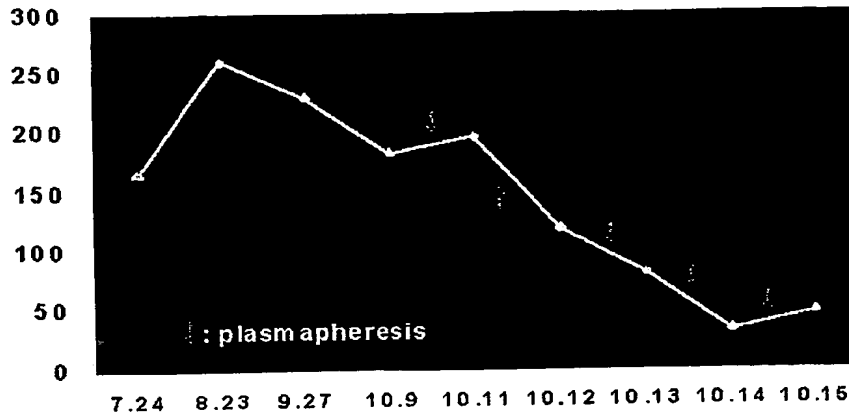


【도 15】

pig-h3 (ng/mg creatinine)



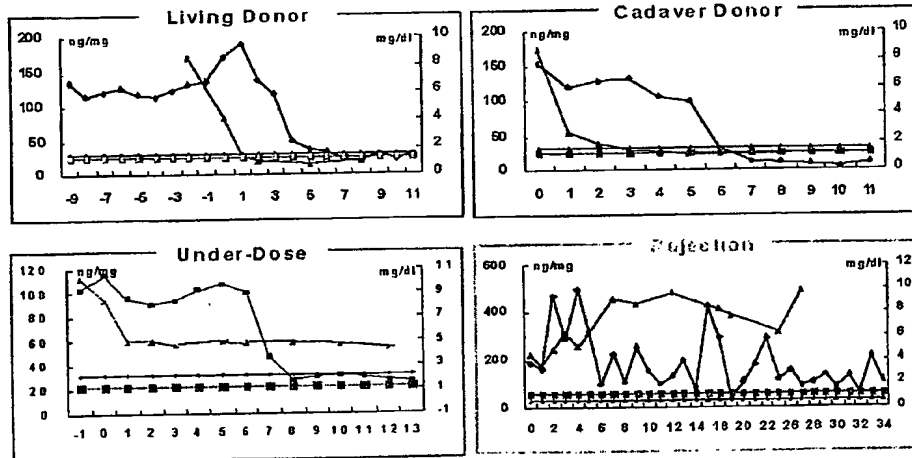
【도 16】

 $\beta$ ig-h3 (ng/mg creatinine)

【도 17】

## Kidney Transplantation

—  $\beta$ ig-h3  
 — Normal  $\beta$ ig-h3  
 — S. creatinine  
 — Normal S. creatinine



## 【서열목록】

<110> KIM, In-San REGEN Biotech. Inc. <120> Method for measuring  
 quantity of  $\beta$ ig-h3 and diagnosis ki <130> 2p-01-29 <160> 10 <170>  
 KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 683 <212> PRT <213> Homo sapiens <400>

1 Met Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu 1 5  
 10 15 Gly Pro Ala Ala Thr Leu Ala Gly Pro Ala Lys Ser Pro Tyr Gln  
 Leu 20 25 30 Val Leu Gln His Ser Arg  
 Leu Arg Gly Arg Gln His Gly Pro Asn Val 35 40  
 45 Cys Ala Val Gln Lys Val Ile Gly Thr Asn Arg Lys Tyr Phe Thr Asn 50  
 55 60 Cys Lys Gln Trp Tyr Gln Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val  
 Ile 65 70 75 80 Ser Tyr Glu Cys  
 Cys Pro Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly 85  
 90 95 Cys Pro Ala Ala Leu Pro Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly  
 Val 100 105 110 Val Gly Ser Thr Thr Thr  
 Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu 115 120  
 125 Arg Pro Glu Met Glu Gly Pro Gly Ser Phe Thr Ile Phe Ala Pro Ser 130  
 135 140 Asn Glu Ala Trp Ala Ser Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser Leu  
 Val 145 150 155 160 Ser Asn Val Asn  
 Ile Glu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val 165  
 170 175 Gly Arg Arg Val Leu Thr Asp Glu Leu Lys His Gly Met Thr Leu  
 Thr 180 185 190 Ser Met Tyr Gln Asn Ser  
 Asn Ile Gln Ile His His Tyr Pro Asn Gly 195 200  
 205 Ile Val Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala 210  
 215 220 Thr Asn Gly Val Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr Ile  
 Thr 225 230 235 240 Asn Asn Ile Gln



0021488

출력 일자: 2002/11/12

Gln Ile Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu 245  
 250 255 Arg Ala Ala Val Ala Ala Ser Gly Leu Asn Thr Met Leu Glu Gly  
 Asn 260 265 270 Gly Gln Tyr Thr Leu Leu  
 Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Ile 275 280  
 285 Pro Ser Glu Thr Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg 290  
 295 300 Asp Leu Leu Asn Asn His Ile Leu Lys Ser Ala Met Cys Ala Glu  
 Ala 305 310 315 320 Ile Val Ala Gly  
 Leu Ser Val Glu Thr Leu Glu Gly Thr Thr Leu Glu 325  
 330 335 Val Gly Cys Ser Gly Asp Met Leu Thr Ile Asn Gly Lys Ala Ile  
 Ile 340 345 350 Ser Asn Lys Asp Ile Leu  
 Ala Thr Asn Gly Val Ile His Tyr Ile Asp 355 360  
 365 Glu Leu Leu Ile Pro Asp Ser Ala Lys Thr Leu Phe Glu Leu Ala Ala 370  
 375 380 Glu Ser Asp Val Ser Thr Ala Ile Asp Leu Phe Arg Gln Ala Gly  
 Leu 385 390 395 400 Gly Asn His Leu  
 Ser Gly Ser Glu Arg Leu Thr Leu Leu Ala Pro Leu 405  
 410 415 Asn Ser Val Phe Lys Asp Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr  
 Arg 420 425 430 Asn Leu Leu Arg Asn His  
 Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr 435 440  
 445 Leu Tyr His Gly Gln Thr Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg 450  
 455 460 Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile  
 Ala 465 470 475 480 Ala His Asp Lys

0021488

출력 일자: 2002/11/12

Arg Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg 485  
490 495 Val Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly  
Asp 500 505 510 Asn Arg Phe Ser Met Leu  
Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr 515 520  
525 Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn 530  
535 540 Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu  
Gly 545 550 555 560 Asp Ala Lys Glu  
Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu 565  
570 575 Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser  
Leu 580 585 590 Gln Gly Asp Lys Leu Glu  
Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val 595 600  
605 Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val 610  
615 620 Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg Pro  
Gln 625 630 635 640 Glu Arg Gly Asp  
Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile Phe Lys Gln 645  
650 655 Ala Ser Ala Phe Ser Arg Ala Ser Gln Arg Ser Val Arg Leu Ala  
Pro 660 665 670 Val Tyr Gln Lys Leu Leu  
Glu Arg Met Lys His 675 680 <210> 2 <211>  
2691 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 2 gcttgcccggt cggtcgctag ctgctcggt  
gcgcgtcgtc ccgtccatg gcgtcttcg 60 tgcggctgct ggctctgcc ctggctctgg  
ccctgggccc cgccgcgacc ctggcgggtc 120 ccgccaagtc gccctaccag ctggtgctgc

agcacagcag gctccggggc cgccagcacg  
ttggcactaa taggaagtac ttcaccaact  
gcaaataac agtcatacagc tacgagtgtc  
agggtgtcc agcagcccta ccactctcaa  
ccaccaccac tcagctgtac acggaccgca  
ccggcagctt caccatcttc gccctagca  
tgctggactc cctggtcagc aatgtcaaca  
tggtagggcag gcgagtcctg actgatgagc  
accagaattc caacatccag atccaccact  
cccggtcct gaaagccgac caccatgcaa  
tcctctccac catcaccaac aacatccagc  
cccttcgggc tgctgtggct gcatcagggc  
acacgctttt ggccccgacc aatgaggcct  
gtatcctggg cgaccagaa gccctgagag  
ctatgtgtgc tgaagccatc gttcggggc  
tggaggtggg ctgcagcggg gacatgtca  
aagacatcct agccaccaac ggggtgatcc  
cagccaagac actatttgaa ttggctgcag  
tcagacaagc cggcctcggc aatcatctct  
ccctgaattc tgtattcaaa gatggaaccc  
ttcggaaacca cataattaaa gaccagctgg

180 gcccacacgt gtgtgtgtg cagaaggta  
240 gcaagcagt gtaccaaagg aaaatctgtg  
300 gtcctggata tgaaaaggc cctggggaga  
360 acctttacga gaccctggga gtcgttgat  
420 cggagaagct gaggcctgag atggaggggc  
480 acgaggcctg ggcctccttg ccagctgaag  
540 ttgagctgtc caatgccctc cgctaccata  
600 tgaaacacgg catgaccctc acctctatgt  
660 atcctaattg gattgtaact gtgaactgtg  
720 ccaacggggg ggtgcacctc atcgataagg  
780 agatcattga gatcgaggac accttgaga  
840 tcaacacgat gcttgaagg aacggccagt  
900 tcgagaagat ccctagttag actttgaacc  
960 acctgctgaa caaccacatc ttgaagtcag  
1020 tgtctgtaga gaccctggag ggcacgacac  
1080 ctatcaacgg gaaggcgatc atctccaata  
1140 actacattga tgagctactc atcccagact  
1200 agtctgatgt gtccacagcc attgaccttt  
1260 ctggaagtga gcggttgacc ctcttggtc  
1320 ctccaattga tgccataca aggaatttgc  
1380 cctctaagta tctgtacat ggacagaccc

tggaaactct gggcggcaaa aaactgagag  
agaacagctg catcgcggcc cagacaaga  
accgggtgct gacccccca atggggactg  
ttagcatgct ggtagctgcc atccagtctg  
gagtctacac agtccttctgcccacaaatg  
ggagcagact cttgggagat gccaaaggaac  
atgaaatcct ggtagcgga ggcacggggg  
acaagctgga agtcagcttg aaaaacaatg  
agcctgacat catggccaca aatggcgtgg  
cagccaacag acctcaggaa agaggggatg  
aacaagcatc agcgttttcc agggcttccc  
aaaagttatt agagaggatg aagcattagc  
cagctctccg ccaatttctc tcagatttcc  
agtatcacac tttaatgtac atgggccgca  
ggggaggagg gagagagatg tactttttaa  
ccactgcatg cagaaacttg gatgtcactg  
ccaaatgtgg aattgactgc ctatgccaag  
gtcataaaa catgaatcaa gcaatccagc  
aagcccttgc acagctggag aatggcatc  
aaatgtgtct cacatctaca cgtggcttgg  
aagaaatggg atgtagagct tagatttccc

1440 tttttgttta tcgtaatagc ctctgcattg  
1500 gggggaggta cgggaccctg ttcacgatgg  
1560 tcatggatgt cctgaaggga gacaatcgct  
1620 caggactgac ggagaccctc aaccgggaag  
1680 aagccttccg agccctgccca ccaagagaac  
1740 ttgccaacat cctgaaatac cacattgggt  
1800 ccctgggtcg gctaaagtct ctccaagggt  
1860 tggtagtgt caacaaggag cctgttgccg  
1920 tccatgtcat caccaatgtt ctgcagcctc  
1980 aacttcgaga ctctgcgctt gagatcttca  
2040 agaggctctgt gcgactagcc cctgtctatc  
2100 ttgaagcact acaggaggaa tgcaccacgg  
2160 acagagactg ttgaaatgtt ttcaaaacca  
2220 ccataatgag atgtgagcct tgtgcatgtg  
2280 atcatgttcc ccctaaacat ggctgttaac  
2340 cctgacattc acttccagag aggacctatc  
2400 tccctggaaa aggagcttca gtattgtggg  
2460 ctcatgggaa gtcctggcac agtttttcta  
2520 attataagct atgagttgaa atgttctgtc  
2580 aggcctttat ggggccctgt ccaggtagaa  
2640 tattgtgaca gagccatggg gtgtttgtaa

0021488

출력 일자: 2002/11/12

```

taataaaacc aaagaaacat a                2691 <210>    3 <211>    585 <212>    PRT <
213>    Homo sapiens <220> <221>    PEPTIDE <222>    (1)..(585) <223>    69 to 653
amino acid sequence of human ID No.1 <400>    3 Tyr Gln Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser
Thr Val Ile Ser Tyr Glu Cys    1                5                10
15 Cys Pro Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly Cys Pro Ala Ala                20
25                30 Leu Pro Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly Val Val Gly Ser
Thr                35                40                45 Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp
Arg Thr Glu Lys Leu Arg Pro Glu Met    50                55                60
Glu Gly Pro Gly Ser Phe Thr Ile Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp    65
70                75                80 Ala Ser Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser
Leu Val Ser Asn Val Asn                85                90                95
Ile Glu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val Gly Arg Arg Val                100
105                110 Leu Thr Asp Glu Leu Lys His Gly Met Thr Leu Thr Ser Met Tyr
Gln                115                120                125 Asn Ser Asn Ile Gln Ile His
His Tyr Pro Asn Gly Ile Val Thr Val    130                135                140
Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala Thr Asn Gly Val    145
150                155                160 Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr
Ile Thr Asn Asn Ile Gln                165                170                175
Gln Ile Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu Arg Ala Ala Val                180
185                190 Ala Ala Ser Gly Leu Asn Thr Met Leu Glu Gly Asn Gly Gln Tyr
Thr                195                200                205 Leu Leu Ala Pro Thr Asn Glu

```

0021488

출력 일자: 2002/11/12

Ala Phe Glu Lys Ile Pro Ser Glu Thr 210 215 220  
 Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg Asp Leu Leu Asn 225  
 230 235 240 Asn His Ile Leu Lys Ser Ala Met Cys Ala  
 Glu Ala Ile Val Ala Gly 245 250 255  
 Leu Ser Val Glu Thr Leu Glu Gly Thr Thr Leu Glu Val Gly Cys Ser 260  
 265 270 Gly Asp Met Leu Thr Ile Asn Gly Lys Ala Ile Ile Ser Asn Lys  
 Asp 275 280 285 Ile Leu Ala Thr Asn Gly Val  
 Ile His Tyr Ile Asp Glu Leu Leu Ile 290 295 300  
 Pro Asp Ser Ala Lys Thr Leu Phe Glu Leu Ala Ala Glu Ser Asp Val 305  
 310 315 320 Ser Thr Ala Ile Asp Leu Phe Arg Gln Ala  
 Gly Leu Gly Asn His Leu 325 330 335  
 Ser Gly Ser Glu Arg Leu Thr Leu Leu Ala Pro Leu Asn Ser Val Phe 340  
 345 350 Lys Asp Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu  
 Arg 355 360 365 Asn His Ile Ile Lys Asp Gln  
 Leu Ala Ser Lys Tyr Leu Tyr His Gly 370 375 380  
 Gln Thr Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg Val Phe Val Tyr 385  
 390 395 400 Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys  
 Ile Ala Ala His Asp Lys 405 410 415  
 Arg Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg Val Leu Thr Pro 420  
 425 430 Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe  
 Ser 435 440 445 Met Leu Val Ala Ala Ile Gln

0021488

출력 일자: 2002/11/12

Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn 450 455 460  
 Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg 465  
 470 475 480 Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu  
 Leu Gly Asp Ala Lys Glu 485 490 495  
 Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser 500  
 505 510 Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp  
 Lys 515 520 525 Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn  
 Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro 530 535 540  
 Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile 545  
 550 555 560 Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg  
 Pro Gln Glu Arg Gly Asp 565 570 575  
 Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile 580 585 <210> 4

<211> 1857 <212> DNA <213> Mouse Intracisternal A-particle <400> 4

gcagggtcccg ccaagtcacc ctaccagctg gtgctgcagc atagccggct ccgggggtcgc 60  
 cagcacggcc ccaatgtatg tgctgtgcag aaggtcattg gcaccaacaa gaaatacttc 120  
 accaactgca agcagtggta ccagaggaag atctgcggca agtcgacagt catcagttat 180  
 gagtgtgtgc ctggatatga aaaggtccca ggagagaaaag gttgcccagc agctcttccg 240  
 ctctcaaadc tgtatgagac catgggagtt gtgggatcga ccaccacaca gctgtataca 300  
 gaccgcacag aaaagctgag gcctgagatg gagggacccg gaagcttcac catctttgct 360  
 cctagcaatg aggcctggtc ttccttgccct gcggaagtgc tggactccct ggtgagcaac 420  
 gtcaacatcg aactgctcaa tgctctccgc taccacatgg tggacaggcg ggtcctgacc 480

gatgagctca agcacggcat gaccctcacc tccatgtacc agaattccaa catccagatc	540
catcactatc ccaatgggat tgtaactgtt aactgtgccc ggctgctgaa ggctgaccac	600
catgcgacca acggcgtggt gcatctcatt gacaaggctca tttccacat caccaacaac	660
atccagcaga tcattgaaat cgaggacacc ttgagacac ttggggccgc cgtggctgca	720
tcaggactca ataccgtgct ggagggcgac ggccagtcca cactcttggc cccaaccaac	780
gaggcctttg agaagatccc tgccgagacc ttgaaccgca tccctgggtga cccagaggca	840
ctgagagacc tgctaaacaa ccacatcctg aagtcagcca tgtgtgctga ggccattgta	900
gctggaatgt ccatggagac cctggggggc accacactgg aggtgggctg cagtggggac	960
aagctcacca tcaacgggaa ggctgtcatc tccaacaaag acatcctggc caccaacggt	1020
gtcattcatt tcattgatga gctgcttacc ccagattcag ccaagacact gcttgagctg	1080
gctggggaat ctgacgtctc cactgccatt gacatcctca aacaagctgg cctcgatact	1140
catctctctg ggaaagaaca gttgaccttc ctggccccc tgaattctgt gttcaaagat	1200
ggtgtccctc gcatcgacgc ccagatgaag actttgcttc tgaaccacat ggtcaaagaa	1260
cagttggcct ccaagtatct gtactctgga cagacactgg acacgctggg tggcaaaaag	1320
ctgcgagtct ttgtttatcg aaatagcctc tgcattgaaa acagctgcat tgctgcccc	1380
gataagaggg gacggtttgg gaccctgttc accatggacc ggatgttgac accccaatg	1440
gggacagtta tggatgtcct gaaggagac aatcgtttta gcatgctggt ggccgccatc	1500
cagtctgcag gactcatgga gatcctcaac cggaagggg tctacactgt ttttgtcccc	1560
accaatgaag cgttccaagc catgcctcca gaagaactga acaaactctt ggcaaatgcc	1620
aaggaactta ccaacatcct gaagtaccac attggtgatg aaatcctggt tagcggaggc	1680
atcggggccc tgggtcggct gaagtctctc caaggggaca aactggaagt cagctcgaaa	1740



0021488

출력 일자: 2002/11/12

aacaatgtag tgagtgtcaa taaggagcct gttgccgaaa ccgacatcat ggccacaaac 1800  
ggtgtggtct atgcatcaa cactgttctg cagccgccag ccaaccgacc acaagaa 1857 <210>  
5 <211> 609 <212> PRT <213> Mouse Intracisternal A-particle <220> <221>  
PEPTIDE <222> (1)..(609) <223> 23 to 641 amino acid sequence of mouse <400>  
5 Ala Gly Pro Ala Lys Ser Pro Tyr Gln Leu Val Leu Gln His Ser Arg 1 5  
10 15 Leu Arg Gly Arg Gln His Gly Pro Asn Val Cys Ala Val Gln Lys  
Val 20 25 30 Ile Gly Thr Asn Arg Lys  
Tyr Phe Thr Asn Cys Lys Gln Trp Tyr Gln 35 40  
45 Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val Ile Ser Tyr Glu Cys Cys Pro 50  
55 60 Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly Cys Pro Ala Ala Leu  
Pro 65 70 75 80 Leu Ser Asn Leu  
Tyr Glu Thr Leu Gly Val Val Gly Ser Thr Thr Thr 85  
90 95 Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu Arg Pro Glu Met Glu  
Gly 100 105 110 Pro Gly Ser Phe Thr Ile  
Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Ala Ser 115 120  
125 Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser Leu Val Ser Asn Val Asn Ile Glu 130  
135 140 Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val Gly Arg Arg Val Leu  
Thr 145 150 155 160 Asp Glu Leu Lys  
His Gly Met Thr Leu Thr Ser Met Tyr Gln Asn Ser 165  
170 175 Asn Ile Gln Ile His His Tyr Pro Asn Gly Ile Val Thr Val Asn  
Cys 180 185 190 Ala Arg Leu Leu Lys Ala

0021488

출력 일자: 2002/11/12

Asp His His Ala Thr Asn Gly Val Val His 195 200  
 205 Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr Ile Thr Asn Asn Ile Gln Gln Ile 210  
 215 220 Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu Arg Ala Ala Val Ala  
 Ala 225 230 235 240 Ser Gly Leu Asn  
 Thr Met Leu Glu Gly Asn Gly Gln Tyr Thr Leu Leu 245  
 250 255 Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Ile Pro Ser Glu Thr Leu  
 Asn 260 265 270 Arg Ile Leu Gly Asp Pro  
 Glu Ala Leu Arg Asp Leu Leu Asn Asn His 275 280  
 285 Ile Leu Lys Ser Ala Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Ala Gly Leu Ser 290  
 295 300 Val Glu Thr Leu Glu Gly Thr Thr Leu Glu Val Gly Cys Ser Gly  
 Asp 305 310 315 320 Met Leu Thr Ile  
 Asn Gly Lys Ala Ile Ile Ser Asn Lys Asp Ile Leu 325  
 330 335 Ala Thr Asn Gly Val Ile His Tyr Ile Asp Glu Leu Leu Ile Pro  
 Asp 340 345 350 Ser Ala Lys Thr Leu Phe  
 Glu Leu Ala Ala Glu Ser Asp Val Ser Thr 355 360  
 365 Ala Ile Asp Leu Phe Arg Gln Ala Gly Leu Gly Asn His Leu Ser Gly 370  
 375 380 Ser Glu Arg Leu Thr Leu Leu Ala Pro Leu Asn Ser Val Phe Lys  
 Asp 385 390 395 400 Gly Thr Pro Pro  
 Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg Asn His 405  
 410 415 Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Leu Tyr His Gly Gln  
 Thr 420 425 430 Leu Glu Thr Leu Gly Gly

Lys Lys Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Asn 435 440  
 445 Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala Ala His Asp Lys Arg Gly 450  
 455 460 Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg Val Leu Thr Pro Pro  
 Met 465 470 475 480 Gly Thr Val Met  
 Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met Leu 485  
 490 495 Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg  
 Glu 500 505 510 Gly Val Tyr Thr Val Phe  
 Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala Leu 515 520  
 525 Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu Ala 530  
 535 540 Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly  
 Gly 545 550 555 560 Ile Gly Ala Leu  
 Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu Glu 565  
 570 575 Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val  
 Ala 580 585 590 Glu Pro Asp Ile Met Ala  
 Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr Asn 595 600  
 605 Val <210> 6 <211> 391 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <  
 223>  $\beta$ ig-h3 D-IV <400> 6 gtttgggacc ctgttcacca tggaccggat gttgacaccc  
 ccaatgggga cagttatgga 60 tgtcctgaag ggagacaatc gtttagcat gctggtggcc  
 gccatccagt ctgcaggact 120 catggagatc ctcaaccggg aagggtcta cactgtttt  
 gctccacca atgaagcgtt 180 ccaagccatg cctccagaag aactgaacaa actcttggca  
 aatgccaagg aacttacaa 240 catcctgaag taccacattg gtgatgaaat cctggttagc

ggaggcatcg gggccctggt 300 gcggtgaag tctctccaag gggacaaact ggaagtcagc  
 tcgaaaaaca atgtagttag 360 tgtcaataag gagcctgttg ccgaaaccga c  
 391 <210> 7 <211> 140 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 $\beta$  ig-h3 D-IV(1X) amino acid sequence <400> 7 Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met  
 Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn 1 5 10  
 15 Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu 20  
 25 30 Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn  
 Glu 35 40 45 Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro  
 Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp 50 55 60  
 Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile 65  
 70 75 80 Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val  
 Arg Leu Lys Ser Leu Gln 85 90 95  
 Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn 100  
 105 110 Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val  
 Val 115 120 125 His Val Ile Thr Asn Val Leu  
 Gln Pro Pro Ala Asn 130 135 140 <210> 8 <211>  
 280 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>  $\beta$  ig-h3 D-IV(2X)  
 amino acid sequence <400> 8 Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys  
 Gly Asp Asn 1 5 10 15 Arg Phe Ser  
 Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu 20  
 25 30 Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn

0021488

출력 일자: 2002/11/12

Glu 35 40 45 Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro  
 Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp 50 55 60  
 Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile 65  
 70 75 80 Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val  
 Arg Leu Lys Ser Leu Gln 85 90 95  
 Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn 100  
 105 110 Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val  
 Val 115 120 125 His Val Ile Thr Asn Val Leu  
 Gln Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro 130 135 140  
 Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met 145  
 150 155 160 Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu  
 Thr Glu Thr Leu Asn Arg 165 170 175  
 Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala 180  
 185 190 Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu  
 Leu 195 200 205 Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His  
 Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly 210 215 220  
 Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu 225  
 230 235 240 Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser  
 Val Asn Lys Glu Pro Val 245 250 255  
 Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr 260  
 265 270 Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn 275

출력 일자: 2002/11/12

73-69

Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu 225  
 230                      235                      240 Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser  
 Val Asn Lys Glu Pro Val                      245                      250                      255  
 Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr                      260  
 265                      270 Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr  
 Val                      275                      280                      285 Met Asp Val Leu Lys Gly Asp  
 Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala                      290                      295                      300  
 Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr 305  
 310                      315                      320 Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe  
 Arg Ala Leu Pro Pro Arg                      325                      330                      335  
 Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu                      340  
 345                      350 Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly  
 Ala                      355                      360                      365 Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu  
 Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu                      370                      375                      380  
 Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp 385  
 390                      395                      400 Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val  
 Ile Thr Asn Val Leu Gln                      405                      410                      415  
 Pro Pro Ala Asn                      420 <210>                      10 <211>                      560 <212>                      PRT <213>  
 Artificial Sequence <220> <223>                       $\beta$  ig-h3 D-IV(4X) amino acid sequence <400>                      10  
 Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn                      1                      5  
 10                      15 Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr

0021488

출력 일자: 2002/11/12

Glu 20 25 30 Thr Leu Asn Arg Glu Gly  
 Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu 35 40  
 45 Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp 50  
 55 60 Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu  
 Ile 65 70 75 80 Leu Val Ser Gly  
 Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln 85  
 90 95 Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val  
 Asn 100 105 110 Lys Glu Pro Val Ala Glu  
 Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val 115 120  
 125 His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro 130  
 135 140 Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser  
 Met 145 150 155 160 Leu Val Ala Ala  
 Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg 165  
 170 175 Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg  
 Ala 180 185 190 Leu Pro Pro Arg Glu Arg  
 Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu 195 200  
 205 Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly 210  
 215 220 Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys  
 Leu 225 230 235 240 Glu Val Ser Leu  
 Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val 245  
 250 255 Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile



0021488

출력 일자: 2002/11/12

Thr 260 265 270 Asn Val Leu Gln Pro Pro  
Ala Asn Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val 275 280  
285 Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala 290  
295 300 Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val  
Tyr 305 310 315 320 Thr Val Phe Ala  
Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg 325  
330 335 Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile  
Leu 340 345 350 Lys Tyr His Ile Gly Asp  
Glu Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala 355 360  
365 Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu 370  
375 380 Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro  
Asp 385 390 395 400 Ile Met Ala Thr  
Asn Gly Val Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln 405  
410 415 Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val  
Leu 420 425 430 Lys Gly Asp Asn Arg Phe  
Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala 435 440  
445 Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala 450  
455 460 Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser  
Arg 465 470 475 480 Leu Leu Gly Asp  
Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile 485  
490 495 Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**